

# **Entwicklung und Synthese allosterischer Hemmstoffe des Apicomplexa Bewegungs- und Invasionsapparates**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Genehmigte Dissertation von  
Dmitrij Malcev, M. Sc.

2019

Schlagworte: Apicomplexa, Malaria, Invasionshemmung, Myosine, Carbazole, Inhibitoren, Selektivität, Parasitämie.

Referent: Prof. Dr. Matthias Preller

Korreferent: Prof. Dr. Holger Butenschön

Tag der Promotion: 10.09.2019

## Zusammenfassung

Die WHO-Agenda zur Malariaeradikation erfordert hohe Investitionen und das Anpassungspotential der *Plasmodium*-Parasiten betont den Bedarf an kontinuierlicher Entwicklung von neuen effektiven Ansätzen. Der unter allen *Apicomplexa*-Parasiten konservierte Fortbewegungs- und Invasionsapparat, das Glideosom, gemeinsam mit seinem zentralen Motorprotein Myosin A, stellt ein attraktives Ziel zur erfolgreichen Hemmung der parasitären Aktivität dar. In dieser Studie wurde die Erhöhung des Effektes eines potentiellen Myosin A-Inhibitors mit biarylischer Grundstruktur durch die Funktionalisierung der *ortho*-Position geprüft. Eine Reihe von *ortho*-substituierten Biarylen wurde aus den *in silico* durchgeführten Strukturmodifizierungen abgeleitet und synthetisiert. Die *one-pot* SUZUKI-MIYAURA-Kreuzkupplung mit angeschlossener Benzylierung lieferte einen effizienten Zugang zu den potentiellen Inhibitormolekülen. Titrierungsexperimente unter Quantifizierung des Effektes der Biaryle auf die ATPase-Aktivität des Myosin A-Modells über die mittlere inhibitorische Konzentration ergaben inhibitorische Aktivitäten der Substanzen im unteren mikro- oder nanomolaren Bereich. Die Proliferation von nicht resistenten und multiresistenten *Plasmodium falciparum* Stämmen 3D7 und 7G8 wurde durch die Biaryle in vergleichbaren Konzentrationsbereichen effektiv gehemmt, wobei die Glideosom-gesteuerten Prozesse der Erythrozyteninvasion und des *Egress* deutlich inhibiert wurden. In den *in vitro* Flashphotolyse-Experimenten wurden Biaryl-bedingte Veränderungen der Akto-Myosin-Kinetik und der ATP-Umsetzungsgeschwindigkeit, sowie eine starke Herabsetzung der Bindeaffinität des Myosin A-Modells zum ATP festgestellt. MD-Simulationen ergaben Interaktionen des veränderten Grundgerüsts im allosterischen Bereich der Aktininteraktion um das LYS274, die mit den *in vitro* Ergebnissen korrelieren und auf eine aktive Veränderung der allosterischen Kommunikation zwischen der Aktin- und Nukleotidbindestelle durch die Biaryle deuten.

Der strukturbasierte Ansatz ermöglichte ebenfalls eine potentielle Erklärung für die selektive Aktivität des Carbazols DBC gegenüber Myosin-9b, während mehrere Isoformen von Myosinen der Klassen 1, 2 und 5 nicht beeinflusst wurden. Ensemble-basierten Dockings und beschleunigte MD-Simulationen deuten auf eine stabile Interaktion des DBC in einer spezifischen Bindestelle im Myosin-9b in der Nähe des Bindebereiches von Blebbistatin hin, die zur Störung der Motoraktivität führen kann. Die entsprechenden Bereiche der Myosine 1, 2 und 5 weisen eine niedrige Homologie zum Myosin-9b auf und sind durch DBC weniger populiert.

## Abstract

The WHO-agenda for the global eradication of severe malaria requires high investments and the potential for adaptation demonstrated by the pathogens highlights the need of continuous progress in development of effective treatments and active agents. The glideosom, which is conserved in all *Apicomplexan* parasites along with its power generating motor myosin A are highly attractive targets for the successful inhibition of plasmodial activity. Here, the structure-based design of active compounds was used to successfully increase the inhibitory potency of potential inhibitors of the parasitic myosin A. The inhibitors are based on a biaryl structure. A small library of *ortho*-substituted candidates was derived during *in silico* structure-activity relationship based modifications and synthesized via the one pot SUZUKI-MIYAUURA cross coupling with subsequent benzylation, which provided an efficient access to substituted biaryls. The *in vitro* inhibitory potency of biaryls toward the isolated myosin A-model of the parasitic motor protein was determined in the range of lower micro- to lower nanomolar concentrations. The inhibitory effect of the biaryl compounds on the proliferation of non-resistant and multi resistant strains of *Plasmodium falciparum* 3D7 and 7G8 was determined in the comparable range of concentrations, indicating the direct effect on the glideosome-related activities like invasion and egress of erythrocytes. The *in vitro* flash-photolysis revealed biaryl-caused changes of acto-myosin-kinetics and ATP-hydrolysis rates of myosin A-model as well as a strong decrease of its binding affinity to ATP. The protein-biaryl-interactions around LYS274 within the binding site close to the actin-binding region, which were determined in MD-simulations, are in a good correlation with experimental data and allow interpreting an active disruption of the allosteric communication between the active site and the actin-binding region by these compounds.

The use of structure-based design allowed the explanation of the increased inhibitory potency of a carbazole DBC towards the ATPase activity of Myosin-9b, while the activity of different isoforms of myosins belonging to class 1, 2 and 5 was unaffected. Ensemble-based docking and accelerated MD-simulations revealed a stable interaction of DBC within a specific binding pocket of myosin-9b in the direct proximity to the binding pocket of blebbistatin, which might lead to the inhibition of motor-activity. The corresponding regions of other myosins exhibited low homology to the myosin-9b and were widely lower or not populated at all.

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
Abstract.....	2
Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis.....	6
1 Einleitung.....	9
1.1 Malaria.....	9
1.2 Der Malariaerreger <i>Plasmodium falciparum</i> .....	10
1.3 Die parasitäre Bewegungsmaschinerie - das Glideosom.....	12
1.4 Myosine als Motorproteine und ihre chemo-mechanischen Eigenschaften .	13
1.5 Aktueller Entwicklungsstand der Malaria-Inhibitoren.....	16
2 Zielsetzung.....	21
3 Materialien und Methoden.....	23
3.1 Chemische Synthesen.....	23
3.1.1 Allgemeine Hinweise und Methoden.....	23
3.1.2 Synthesevorschriften.....	24
3.2 Enzymatische Monoverseifung.....	61
3.2.1 Materialien und Chemikalien.....	61
3.2.2 Vorschrift der enzymatischen Umsetzung.....	61
3.3 <i>In vitro</i> SAR-Untersuchungen.....	64
3.3.1 <i>Steady-state</i> ATPase Assay.....	64
3.3.2 MST-Experimente.....	66
3.3.3 Parasitäre Experimente.....	67
3.3.4 Bestimmung der Zytotoxizität (CC <sub>50</sub> ).....	68
3.4 Flashphotolyse.....	69
3.5 <i>In silico</i> SAR-Untersuchungen.....	69
3.5.1 Erzeugung von Homologiemodellen.....	69
3.5.2 Molekulares Protein-Ligand-Docking.....	70

3.5.3	Strukturensemble-basiertes molekulares Docking .....	70
3.5.4	Molekulardynamische Simulationen.....	71
4	Ergebnisse .....	74
4.1	Synthesen der Biaryl-derivate.....	75
4.1.1	Optimierung der <i>one-pot</i> SUZUKI-MIYAUURA-Kreuzkupplung.....	76
4.1.2	Synthesen der Biaryl-derivate .....	79
4.1.3	Biomimetische Synthese von Biaryl-Derivaten.....	86
4.2	Einfluss der <i>ortho</i> -Funktionalisierung auf die inhibitorische Wirksamkeit ....	91
4.2.1	Funktionalisierung der <i>ortho</i> -Position mit MeO- und OH-Gruppen.....	91
4.2.2	Einfluss der Polarität und Sterik der <i>ortho</i> -Funktionalisierung .....	98
4.3	Studien der Struktur-Aktivitätsbeziehung (SAR) .....	101
4.3.1	<i>In vitro</i> Experimente zur Aktivitäts- und Affinitätsbestimmung .....	101
4.4	Ermittlung der Zytotoxizität der Biaryl-Derivate .....	104
4.5	Effekt auf die parasitäre Entwicklung im Blutstadium .....	105
4.5.1	Effekt der Biaryle auf die Zellproliferation des <i>P. falciparum</i> .....	105
4.5.2	Effekt auf die Zellproliferation über 24 h .....	107
4.5.3	Effekt auf die Zellproliferation des resistenten <i>Pf</i> -Stammes 7G8.....	111
4.6	Hintergrund des inhibierenden Effektes auf das parasitäre Myosin A .....	112
4.6.1	<i>In silico</i> Ermittlungen der Struktur-Aktivitätsbeziehung .....	112
4.6.2	Allosterische Kommunikation innerhalb der <i>Cleft</i> des Myosin A .....	116
4.6.3	Bereiche der <i>Cleft</i> in Protein-Biaryl-Komplexen.....	121
4.6.4	ATP-induzierte Dissoziation des Akto-Myosin-Komplexes.....	123
4.7	Strukturbasierter Ansatz zur Aufklärung der Selektivität von DBC .....	125
4.7.1	Ensemble-basiertes molekulares Docking .....	127
4.7.2	Die inhibitorische Aktivität von DMC .....	133
4.7.3	Wechselwirkungen von DBC und DMC mit <i>Rn</i> Myosin-9b.....	135
5	Diskussion .....	137
5.1	Synthesen von <i>ortho</i> -funktionalisierten Biarylen.....	137

5.1.1	<i>One-pot</i> SUZUKI-MIYAURA-Kreuzkupplung .....	137
5.1.2	Alternative Zugangsroute zu den nitrofunktionalisierten Inhibitoren....	140
5.1.3	Biomimetischer Weg und enzymatische Umsetzung des Biaryls.....	140
5.2	Studien der Struktur-Aktivitätsbeziehung der Biaryle.....	142
5.2.1	<i>Ortho</i> -Funktionalisierung und inhibitorischer Effekt der Biaryle.....	142
5.2.2	Benzylester entscheidend für die inhibitorische Aktivität.....	143
5.2.3	Effekt der Biaryle auf die Allosterie im Myosin A.....	144
5.3	Niedrige toxische Wirkung der biarylischen Inhibitoren .....	146
5.4	Hohe inhibitorische Aktivität gegenüber <i>Plasmodium falciparum</i> .....	146
5.5	DBC-Selektivität resultiert aufgrund einer spezifische Position im Myosin-9	148
6	Literaturverzeichnis .....	150
7	Anhang.....	159
7.1	NMR-Spektren.....	159
7.2	Bestimmung der Taschenvolumina .....	204
7.2.1	Vergleich der Zusammensetzung der allosterischen Taschen 1 und 2	204
7.3	Messungen der Cleftbereiche.....	206
8	Lebenslauf.....	207
	Berufserfahrung.....	207

## Abkürzungsverzeichnis

WHO ( <i>World Health Organization</i> )	Weltgesundheitsorganisation
Äq.	Äquivalente
ACT ( <i>Artemisinin-based Complex Therapy</i> )	Artemisinin-basierte Komplextherapie
°C	Grad Celsius
BSA ( <i>bovine serum albumine</i> )	Bovines Serumalbumin
HPLC ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
TRAPs ( <i>Thrombospondin Anonymous Repeat Proteins</i> )	Thrombospondin nachahmendes Protein
GAP45/50 ( <i>Glideosome Associated Protein</i> )	Glideosom-assoziierte Proteine 45/50
MTIP ( <i>Myosin A Tail domain Interacting Protein</i> )	Myosin A-Hebelarmdomänen-interagierendes Protein
MLC ( <i>Myosin Light Chain</i> )	Leichte Kette des Myosins
IMC ( <i>Inner Membrane Complex</i> )	Innerer Membrankomplex
gr.	griechisch
ges./gef.	gesucht/gefunden
MD (-Simulationen)	Molekulardynamisch
$\Delta G$	Differenz der Gibbs-Energie
kcal/mol	Kilokalorien pro Mol
kDa (atomare Masseneinheit)	Kilodalton
NMR ( <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> )	Kernspinresonanzspektroskopie
$F$ (Physikalische Größe)	Brennweite (einer Linse)
RT	Raumtemperatur
et al. (u. a.)	und andere
h (Einheit der Zeit; <i>hours</i> )	Stunden
m (math.) oder m (phys. Größe oder Einheit)	Steigung oder Masse oder Meter
M (Konzentrationseinheit)	mol/L
[M] (Massenspektrometrie)	Molekül
ges./gef.	gesucht/gefunden
$\log_{10}$ (math.)	Logarithmus zur Basis 10
SASA ( <i>Solvent Accessible Surface Area</i> )	Lösungsmittelzugängliche Oberfläche
Å (Angström; Längeneinheit)	100 pm
$\mu$ -, n-, pm (Längeneinheit)	Mikro-, Nano-, Picometer
$\pi$ -System (chem.)	Aromatisches Elektronensystem

ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
P <sub>i</sub>	Anorganisches Phosphat (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )
PDB	ProteinDatenBank
1LKX, 2JJ9, 1MMD, 4ZG4, 1W7J.....	Identifikationscodes der PDB-Strukturen
ns (Zeiteinheit)	nanosekunden
<i>Dd</i> ( <i>Dictyostelium discoideum</i> )	Schleimpilz
RMSD ( <i>Root Mean Square Deviation</i> )	Abweichung des quadratischen Mittelwerts
IQR ( <i>InterQuartile Range</i> ; Box-Plot)	Interquartiler Bereich eines Box-Diagramms
IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration
EC <sub>50</sub>	Mittlere effektive Konzentration
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
UV-(Licht)	Ultraviolettes Licht
δ (sigma)	Chemische Verschiebung eines NMR-Signals
COSY ( <i>COrelated Spectroscopy</i> )	Korrelationspektroskopie
HMBC ( <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> )	Heteronukleare Korrelationspektroskopie über mehrere Bindungen
HSQC ( <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i> )	Heteronukleare Korrelationspektroskopie über eine Bindung
HRMS ( <i>High-Resolution Mass Spectrometry</i> )	Hochaufgelöste Massenspektrometrie
ESI ( <i>Electrospray Ionization</i> )	Elektrosprayionisation
EtOAc	Ethylacetat
<i>P. (falciparum/vivax</i> usw.)	<i>Plasmodium falciparum/vivax</i>
PE	Petrolether
pH-Wert	-log <sub>10</sub> (c(H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> ))
R <sub>f</sub> -Wert (Dünnschichtchromatographie)	Retentionsfaktor
MHz/Hz (Frequenzeinheit)	Mega-Hertz
ppm ( <i>Parts Per Million</i> )	Einheit der Signalverschiebung im NMR
J (NMR)	Kopplungskonstante
T <sub>b</sub>	Siedetemperatur
TBDMS(Cl)	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl(chlorid)
TIPS(Cl)	Triisopropylsilyl(chlorid)
Et <sub>2</sub> O	Diethylether
Et <sub>3</sub> N	Triethylamin

Pd/C	Palladium auf Aktivkohle
min (Zeiteinheit)	Minuten
Y ( <i>Yield</i> )	Ausbeute
SAR ( <i>Structure-Activity-Relationship</i> )	Struktur-Aktivitätsbeziehung
G/F-Aktin	globuläres/filamentöses Aktin
MOPS	3-( <i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
w/v ( <i>weight to volume</i> )	Massenkonzentration
c	Konzentration
cATP ( <i>cached ATP</i> )	Gekoppeltes (deaktiviertes) ATP
rpm ( <i>Revolutions Per Minute</i> )	Umdrehungen pro Minute
PDB ( <i>Protein Data Base</i> )	Proteindatenbank
Hs ( <i>Homo sapiens</i> )	Mensch
Gg ( <i>Gallus gallus</i> )	Bankivahuhn
Rn ( <i>Rattus norvegicus</i> )	Wanderratte
Ai ( <i>Argopecten irradians</i> )	Jakobsmuschel
NAMD ( <i>NANoscale Molecular Dynamics</i> )	Programm zur Simulation von molekulardynamischen Prozessen
CHARMM36 (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics)	Kraftfeld in MD-Simulationen
Tos(Cl)	Tosyl(chlorid)

# 1 Einleitung

## 1.1 Malaria

Dem Bericht der Weltgesundheitsorganisation (WHO) des Jahres 2018 zu folge, befinden sich zurzeit in etwa 3.2 Milliarden Menschen weltweit in Gefahr mit Malaria infiziert zu werden<sup>1</sup>. Vor allem in den endemischen Regionen, zu denen die Länder der tropischen und subtropischen Gebiete zählen, wurden 219 Millionen Erkrankungsfälle mit 435000 Todesfällen gemeldet. Unter den Todesfällen stellt der Anteil der Kinder unter fünf Jahren 61% dar. Auch wenn die Gesamtzahl der Todesfälle im Vergleich zu den Berichten der Vorjahre rückläufig ist, ist die Anzahl an Neuinfektionen im Vergleich zum Jahr 2015 um 5 Millionen angestiegen.

Die Infizierung mit dem Malariaparasiten erfolgt durch den Stich einer weiblichen *Anopheles*-Mücke, die den biologischen Vektor darstellt. Die Erreger sind einzellige *Apicomplexa*-Spezies der Gattung *Plasmodium*. Zu den humanpathogenen Parasiten, die unterschiedliche Arten der Malariaerkrankung hervorrufen, zählen *P. ovale* (*Malaria tertiana*), *P. malarie* (*Malaria quartana*), *P. knowlesi*, *P. vivax* (*Malaria tertiana*) und *P. falciparum* (*Malaria tropica*)<sup>2</sup>. Die meisten Todesfälle sind auf die *Malaria tropica* und *P. falciparum* zurückzuführen<sup>31</sup>. An der Oberfläche des durch diesen Parasiten befallenen Erythrozyten befinden sich parasitäre Proteine, die das Anheften an das Kapillarendothel und gesunde Erythrozyten ermöglichen. Dies führt zur Rosettenbildung und kann Verstopfungen von Blutgefäßen hervorrufen<sup>45</sup>. Multiorganversagen oder bis ins Koma reichende neurologische Beschwerden aufgrund der Verstopfung von zerebralen Gefäßen sind lebensgefährliche Folgen der Infektion mit *P. falciparum*<sup>67</sup>.

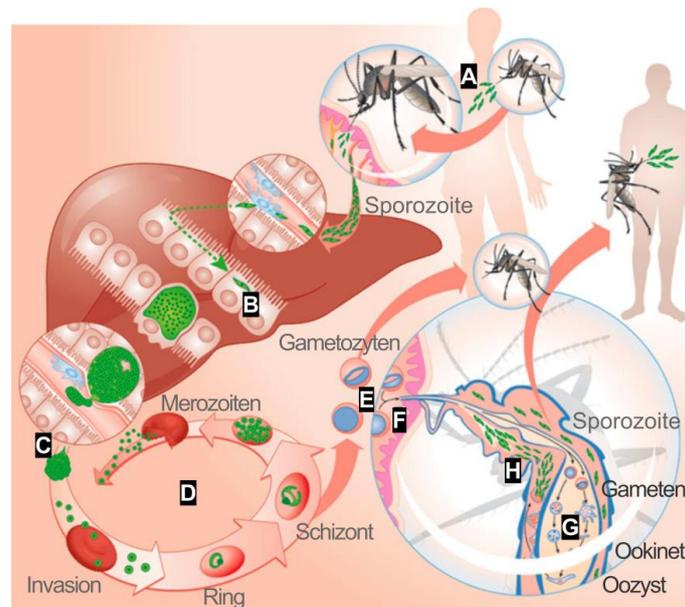
Zur Behandlung einer Malariainfektion wird überwiegend die Artemisinin-basierte Komplextherapie (ACT) verwendet. Dieser Ansatz bleibt seit einigen Jahren effektiv, wird allerdings zunehmend durch den Malaria-Parasiten aufgrund der Entwicklung von Resistenzen gegenüber einzelnen Wirkstoffen der Therapie umgangen<sup>1</sup>. Zudem greifen die zugelassenen Antimalaria-Wirkstoffe überwiegend die metabolischen Prozesse des Parasiten an. Diese können allerdings in den verschiedenen Stadien der parasitären Entwicklung starke Unterschiede im Ablauf und Ausprägung aufweisen. Zusätzlich können entwicklungs- und wirkstoffbedingte Mutationen in den beteiligten Proteinen zur weiteren Minderung der Wirksamkeit führen. Die Komplexität der parasitären Proliferation im Organismus des infizierten Wirtes ist eine fortbestehende Hürde bei der Entwicklung einer geeigneten Vakzination. Sollte die

Entwicklung der neuartigen Behandlungs- und Vakzinationsmethoden unverändert bleiben, droht sowohl die Zahl der Infektionen als auch die Zahl der Todesfälle erneut zu steigen.

## 1.2 Der Malariaerreger *Plasmodium falciparum*

Der Erreger der *Malaria tropica*, *P. falciparum*, weist einen komplexen Lebenszyklus auf<sup>8</sup>. Dieser besteht aus einer geschlechtlichen und einer ungeschlechtlichen Entwicklungsphase, die jeweils in der *Anopheles*-Mücke und im humanen Wirtssystem stattfindet. In beiden Phasen durchläuft der Parasit diverse Transformationen, die eine intensive Proliferation ermöglichen. Während der ungeschlechtlichen Entwicklung von *P. falciparum* wird zwischen Leberstadium und Erythrozytenstadium unterschieden (Abbildung 1)<sup>9</sup>. Mit dem Speichel der *Anopheles*-Mücke gelangen parasitäre Sporoziten in die Blutbahn des Wirtes, erreichen die Leber und befallen die Hepatozyten. Nach den intensiven Transformations- und Replikationsfolgen entstehen hier tausende Merozoiten, die durch die Merosomenabschnürung erneut in die Blutbahn gelangen und durch Invasion der roten Blutkörperchen das Erythrozytenstadium der Proliferation einleiten<sup>10,11</sup>.

Der Prozess der Erythrozyten-Invasion durch den Parasiten wurde eingehend studiert<sup>12-16</sup> (Abbildung 1 und 2). Kontaktproteine auf der Membranoberfläche des Erythrozyten ermöglichen dem Parasiten die Erkennung und das Anbinden an der Wirtszelle (Abbildung 2 I). Nach der Reorientierung des Parasiten mit dem apikalen Ende erfolgt ein stärkeres Anbinden durch die Interaktion zwischen dem parasitären Antigenen EBA-175 (*Erythrocyte Binding Antigen*) und den GlycophorinA Rezeptoren der Erythrozytoberfläche, nachgefolgt von der Ausbildung einer *Tight-Junction* (Abbildung 2 II und III). Die Oberfläche des Erythrozyten wird eingewölbt und unter Ausbildung einer parasitären Vakuole dringt der Parasit vollständig in den Erythrozyten ein (Abbildung 2 IV und V). Die Ausbildung der Vakuole verhindert die Fusion des Merozoits mit den Lysosomen und somit den intrazellulären Abbau des Parasiten<sup>9</sup>. Somit kann sich der Parasit im Erythrozyt ungehindert vermehren.



**Abbildung 1: Der detaillierte Lebenszyklus des *Plasmodium falciparum*.** A) Stich der Anopheles-Mücke und Injektion der Sporozoiten. B) Befall der Hepatozyten in der Leber. C) Beginn des Erythrozytenstadiums mit dem Egress der Merozoiten aus den Hepatozyten. D) Replikation im Erythrozyten. E) Ausbildung von Mikro- und Makrogametocyten. F) Aufnahme der Gametocyten durch die *Anopheles*-Mücke und Beginn der geschlechtlichen Vermehrung. G) Differenzierung zu Mikro- und Makrogameten, Ookineten-Bildung, Entwicklung zu den Oozysten. H) Ausbildung von Sporozoiten und Übertragung auf den nächsten Wirt. Abbildung von Portugal *et al.* übernommen und modifiziert<sup>17</sup>.

Im Erythrozyten transformiert sich der Merozoit vom Ring zum Trophozoiten und anschließend zum Schizonten (Abbildung 1 D). In Trophozoiten-Form weist der Parasit einen hohen Metabolismus auf und baut bis zu dreiviertel des zur Verfügung stehenden Hämoglobins in der parasitären Nahrungsvakuole ab<sup>18</sup>. Im Stadium des Schizonten werden durch den Prozess der Schizogonie bis zu 30 neue invasionsfähige Merozoiten gebildet, die nach dem Egress (Ausbruchprozess) zum Zweck der weiteren Vermehrung andere Erythrozyten invadieren können<sup>19</sup>. Im Erythrozyten können die Merozoiten ebenfalls zu den geschlechtlichen Formen, den maskulinen Mikrogametocyten und den femininen Makrogametocyten, weiter entwickelt werden. Beide Formen können von einer weiteren *Anopheles*-Mücke während der Blutnahme aufgenommen werden, bei welcher im Mitteldarm die geschlechtliche Form der Entwicklung initiiert wird. Nach der Differenzierung zu den entsprechenden Mikro- und Makrogameten verschmelzen die parasitären Zellen zu den beweglichen Zygoten (Ookineten). Die Ookineten können die Mitteldarmzellen durchqueren und sich in dem Zwischenraum der Epithelschicht und der Basalmembran der Mitteldarmwand zu Oozysten weiterentwickeln<sup>20</sup>. Aus den Oozysten können tausende Sporozoiten entstehen, die in die Speicheldrüse der Mücke gelangen und erneut auf einen menschlichen Wirt übertragen werden.

### 1.3 Die parasitäre Bewegungsmaschinerie - das Glideosom

Die Migration innerhalb des Wirtsorganismus, die Invasion und der Egress sind essentiell für die Proliferation und das Überleben von *Apicomplexa*-Parasiten. Neben der profitablen Flexibilität des parasitären Zytoskeletts, welches sowohl die strukturelle Integrität als auch die Anpassung der Zellform ermöglicht, bildet ein Multiprotein-Komplex, das Glideosom, die molekulare Basis des Bewegungsverhaltens von *Apicomplexa*-Parasiten (Abbildung 2)<sup>21</sup>.

Das Glideosom befindet sich im pelikularen Raum zwischen der Plasmamembran und dem inneren Membrankomplex (IMC) des Parasiten (Abbildung 2)<sup>9</sup>. Das unkonventionelle Motorprotein der Klasse 14, Myosin A, tritt hierbei als das Kraft- und Bewegung-generierende Protein auf. Dieses Motorprotein ist über die Hebelarm-Domäne mit der leichten Kette MTIP (*Myosin A Tail domain Interacting Protein*) verbunden, welche das Glideosom gemeinsam mit den membranassoziierten Proteinen GAP50 und GAP45 (*Glideosome Associated Proteins*) an die äußere Membran des inneren Membrankomplexes bindet<sup>8,22,23</sup>. Studien der genomsequentiellen Gemeinsamkeiten der *Apicomplexa*-Parasiten zeigten, dass Homologe der GAPs, MTIP/MLCs und des Myosin A in ihrem Genom kodiert sind. Dadurch kann angenommen werden, dass der Aufbau des Glideosoms in allen invasionsfähigen *Apicomplexa*-Spezies konserviert ist (Abbildung 2)<sup>23</sup>.

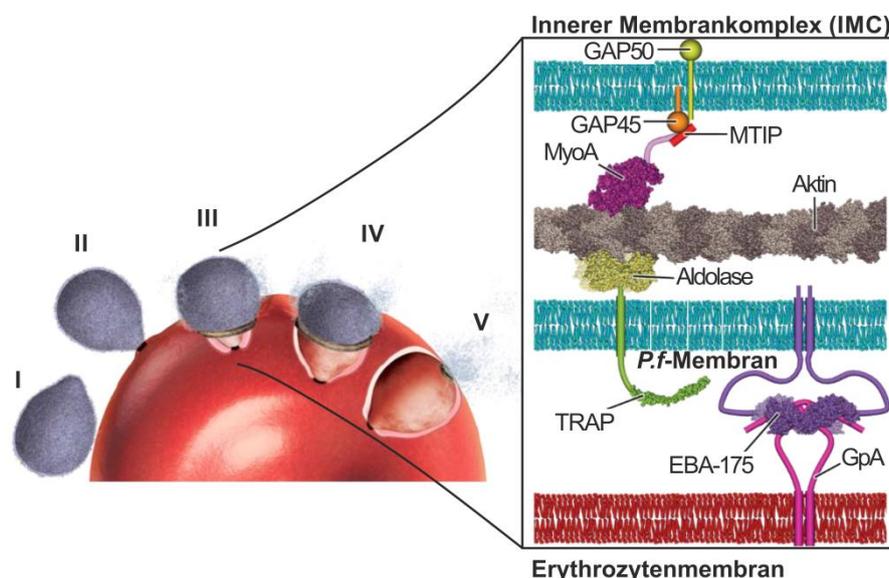


Abbildung 2: Prozess der Parasiteninvasion in den Erythrozyten und die Glideosom-Konstruktion<sup>8</sup>.

Im generellen Modell der Bewegungsmaschinerie wird der Rezeptorkomplex der parasitären Oberfläche über TRAPs (*Thrombospondin Anonymous Repeat Proteins*) und Aldolasen mit dem F-Aktin des Parasiten verlinkt (Abbildung 2). Die Kopf-

Domäne des Myosin A interagiert in einer ATP-abhängigen Weise mit Aktin. Diese Interaktion stellt den bewegungsgenerierenden Akto-Myosin-Komplex, der die chemische Energie der ATP-Hydrolyse in mechanische Bewegung umsetzt. Durch die vom Myosin A generierte Kraft werden die Aktinfilamente entlang der Membranausrichtung verschoben. Im Zusammenspiel mit der festen Interaktion mit der Zelloberfläche des Erythrozyten entsteht aufgrund der Aktinverschiebung eine gerichtete Vorwärtsbewegung des Parasiten, wodurch er in die Zelle des Wirtes hineingedrückt wird und die Proliferation starten kann (Abbildung 2)<sup>8,9</sup>.

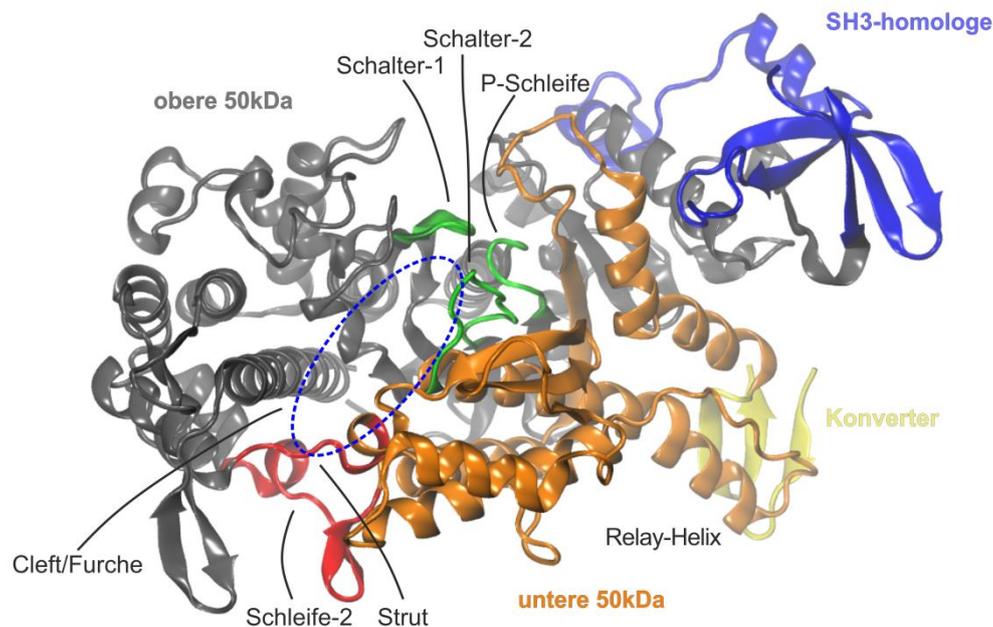
Das Glideosom ist überlebenswichtig für *Apicomplexa*-Parasiten inklusive der *Plasmodium*-Spezies, die Malaria hervorrufen. Der Proteinkomplex und das energiegenerierende Myosin A ermöglichen die Fortbewegung, sowie die für die Proliferation bedeutenden Prozesse Invasion und Egress. Die Entwicklung von aktiven Substanzen, die die Aktivität des Myosin A selektiv hemmen, kann somit einen erfolgsversprechenden Ansatz zur Bekämpfung von Malariainfektionen darstellen.

#### 1.4 Myosine als Motorproteine und ihre chemo-mechanischen Eigenschaften

Myosine sind Aktin-basierte Motorproteine, die eine große Zahl an zellulären Prozessen und Funktionen in Eukaryoten antreiben<sup>24-27</sup>. Im Zusammenspiel mit den Aktinfilamenten konvertiert die Myosinmotordomäne die chemische Energie der hydrolytischen ATP-Spaltung in mechanische Bewegung. Der Aufbau der Motordomäne der Myosine ist hochkonserviert. Anhand der phylogenetischen Analysen werden Myosine in bis zu 34 unterschiedliche Klassen eingeteilt<sup>28-30</sup>. Die Myosine des Muskelskeletts, des Herzmuskels, der glatten Muskulatur und Nicht-Muskel-Myosin-2 werden als konventionelle Myosine bezeichnet. Alle anderen Myosine, inklusive des parasitären Myosin A, welches zu der Klasse 14 zählt, gehören zu der Untergruppe der unkonventionellen Myosine<sup>29,31</sup>.

Die antreibende Eigenschaft des Myosin-Motors findet Einsatz in der Muskelkontraktion und in einer großen Anzahl an physiologischen, zellulären und regulatorischen Prozessen der Lebewesen und Pflanzen. Eine große Anzahl an Studien bestätigt eine enge Einbindung in den Verlauf oder in die Entstehung akuter und gravierender Erkrankungen wie kardiovaskulärer Störungen, Störungen des zentralen Nervensystems und der Sinnesorgane, sowie Tumorenbildung und Malaria<sup>32,33,34</sup>. Diese Zusammenhänge verdeutlichen die Bedeutung der genauen Erforschung der Motorproteine zur Findung von neuartigen Ansätzen und Behandlungsmethoden.

Die Motordomäne aller Myosine besteht aus unterschiedlichen Subdomänen (Abbildung 3). Die größten Domänen stellen die untere und die obere 50kDa-Domänen dar. Die 50kDa-Domänen sind über ihre Sekundärstrukturelemente mit zwei kleinen terminalen Domänen verknüpft: der C-terminalen Konverter-Domäne und der N-terminalen SH3-homologen-Domäne (auch als *src homology 3* bezeichnet) (Abbildung 3)<sup>31</sup>. Der Konverter ist die letzte Domäne des Myosinkopfes und stellt das Bindelement zur für den Kraftschlag bedeutenden Hebelarmdomäne dar.



**Abbildung 3: Die Myosin-Motordomäne mit den wichtigen Strukturelementen und Regionen.**

Die untere und obere 50kDa-Domäne werden durch Schleife-2 und die Strut-Schleife verbunden, wobei zwischen den Domänen eine Furche (*Cleft*) besteht. Durch die Nukleotid-abhängige Bewegung der Domänen kann die *Cleft* eine geschlossene und eine offene Konformation annehmen<sup>31,35</sup>. Die Schleife-2 ist bei dem Übergang von der metastabilen zur starken Aktin-Bindung beteiligt. Sequenziell stellt diese Region die variabelste unter allen Myosinen dar<sup>36</sup>. Ergebnisse zahlreicher Studien deuten auf eine Abhängigkeit der funktionellen Eigenschaften der Myosin-Motordomänen von der Länge sowie der Ladungsverteilung innerhalb der Schleife-2<sup>37-41</sup>. Die Schalter-1, Schalter-2 und P-Schleife grenzen die Nukleotidbindestelle ein und werden als Nukleotid-erkennende-Schleifen (*nucleotide sensing loops*) bezeichnet (Abbildung 3). Die allosterische Kommunikation zwischen der Nukleotidbindestelle und dem Bereich der Aktin-Interaktion wird mitunter durch die *Transducer*-Region vermittelt. Diese stellt einen Teil der 50kDa-Domänen dar und besteht aus sieben  $\beta$ -Faltblättern (Abbildung 3).

Die mechanische Bewegung des Akto-Myosin-Komplexes ist das Ergebnis eines zyklischen chemo-mechanischen Prozesses der Kraftgenerierung innerhalb der Motordomäne, der als ATP-Zyklus (*active cycle*) bezeichnet wird (Abbildung 4).

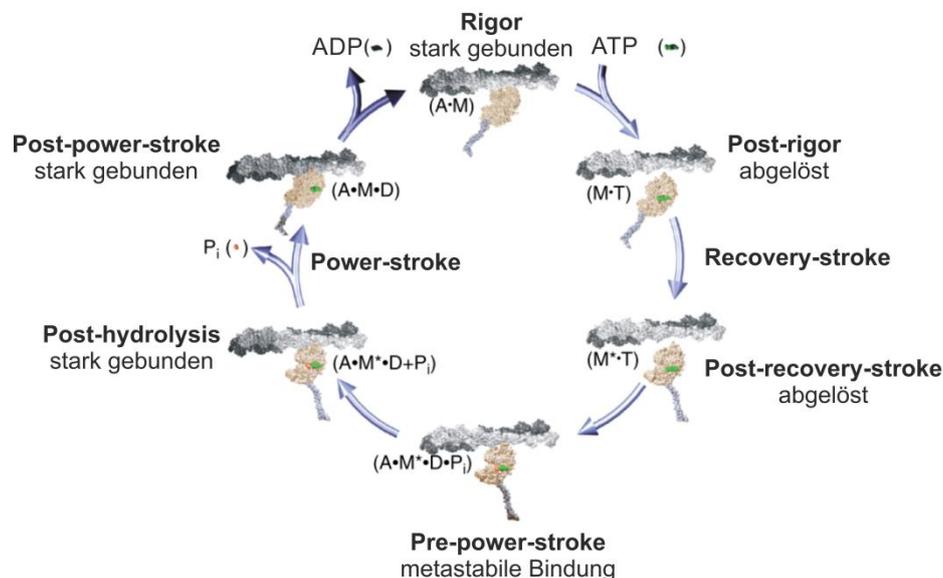


Abbildung 4: ATPase-Zyklus (*active cycle*) des Akto-Myosin-Komplexes.

Die ATP-Bindung in der Nukleotidbindestelle der Motordomäne, sowie die anschließende Hydrolyse des Nukleotids starten eine Sequenz von kleinen konformationellen Änderungen innerhalb aller Bereiche des Myosins<sup>31,42</sup>. Aufgrund der allosterischen Veränderungen wird die Motordomäne vom Aktinfilament abgelöst und der Hebelarm nimmt seine Position vor dem Kraftschlag an (Abbildung 4, *post-rigor* zum *post-recovery-stroke*). Das Motorprotein bindet anschließend in einer metastabilen Bindung an Aktin (Abbildung 4, *pre-power-stroke*). Nach der ATP-Hydrolyse wird die Bindung stabilisiert (Abbildung 4, *post-hydrolysis*). Die Prozesse der Phosphatfreisetzung und des Kraftschlages, die im nächsten Schritt erfolgen, sind eng verknüpft und können zeitlich nicht genau aufgelöst werden, um eine genaue Aussage über deren Reihenfolge zu tätigen<sup>43–47</sup>. Durch den Kraftschlag (*power-stroke*) der Motordomäne wird die entsprechende Aktinbewegung vollbracht, woraufhin das Adenosindiphosphat ebenfalls freigesetzt wird. Kinetische Studien zeigen, dass die Freisetzung des ADP deutlich langsamer erfolgt als die des Phosphations, weshalb die Phosphatfreisetzung als kraftgenerierender Schritt des ATP-Zyklus definiert wird<sup>48,31</sup>. Nach der ADP-Freisetzung wird der Zyklus durch die ATP-Beladung der Kopfdomäne erneut durchgeführt.

Durch kristallographische und computerchemische Studien wurde ein allosterischer Kommunikationspfad zwischen der Bindetasche der fünffach halogenierten Pseudili-

ne in der Nähe der Aktin-bindenden Region und der Nukleotidbindestelle gezeigt, der eine Aminosäuren-Interaktionskette um LYS265 beinhaltet<sup>49,50</sup>. Die Interaktion des Inhibitormoleküls mit LYS265 wurde als die Ursache für die Störung der ATP-Hydrolyse postuliert, wodurch die Rolle des LYS265 in der allosterischen Kommunikation zwischen dem Bereich der Aktininteraktion und der Nukleotidbindestelle verdeutlicht wurde. Die Schalter-1 und -2, sowie die P-Schleife sind sowohl in den Prozess der ATP-Bindung als auch in den Prozess der Hydrolyse und der Produktfreisetzung stark eingebunden<sup>49,51</sup>. Mutationsstudien bestätigten ebenfalls eine wichtige Rolle in der Kommunikation der beiden Schalter miteinander über die Ausbildung einer Salzbrücke unter Beteiligung von Arginin und Glutamat<sup>37,52</sup>. Die Einschränkungen in der Ausbildung der Salzbrücke oder das feste Binden der gezielt mutierten Aminosäuren der Schalter führten zur signifikanten Herabsetzung der ATP-Affinität, der ATP-Hydrolyse, sowie der Myosinaffinität zum Aktin<sup>53</sup>. Diese Ergebnisse verdeutlichen die allosterische Kommunikation zwischen der Nukleotid- und der Aktinbinderegionen unter Beteiligung von verschiedenen Subdomänen der Myosin-Kopfdomäne.

Die Kopfdomäne des Motorproteins Myosin stellt ein komplexes chemo-mechanisches System dar. Die allosterische Kommunikation zwischen unterschiedlichen Domänen des Myosins ermöglicht eine gezielte Modulierung von myosin-gebundenen Funktionen, die mit physiologischen Fehlfunktionen oder Krankheiten verbunden sind. Daher kommt dem genauen Verständnis von mechanistischen Zusammenhängen innerhalb der Myosine eine wichtige Bedeutung zu.

### 1.5 Aktueller Entwicklungsstand der Malaria-Inhibitoren

Vor allem das häufige Auftreten von Resistenzfällen der Malaria-Parasiten gegenüber den derzeit verwendeten Medikamenten verdeutlicht das Bedürfnis an neuen Ansätzen und Wirkstoffen, die idealerweise in allen Stadien des Parasiten aktiv sind. Trotz finanzieller Vernachlässigung der Malariaforschung<sup>1</sup>, sind in den letzten Jahren einige neue Verbindungen mit Antimalaria-Aktivität entdeckt worden.

Verbindungen auf der Basis von 4-Arylpyrrolidin als Leitstruktur wurden von Meyers *et al.* als hochpotente Malaria-Inhibitoren berichtet<sup>54</sup>. Unter Verwendung der *Pf-Stämme* 3D7 und Dd2 sowie eines Mausmodells wurde 4-Aryl-*N*-benzylpyrrolidin-3-carboxamid als die effektivste Verbindung *in vitro* und *in vivo* identifiziert (Abbildung 5). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit den 4-Arylpyrrolidin-basierten Malaria-Inhibitoren (Abbildung 5) vermutete die Gruppe die Inhibierung der parasitären

Aspartatproteasen als den Ursprung der hemmenden Wirkung, konnte allerdings an den isolierten Proteinen keinen eindeutigen Effekt nachweisen. Aspartatproteasen sind nahezu in allen Stadien des parasitären Lebenszykluses vertreten und können ein attraktives Target für die Inhibierung des Malariaparasiten darstellen<sup>55</sup>. Die potentielle Verbesserung der Wirksamkeit des entdeckten Grundgerüsts durch die Feststellung des Wirkortes im Parasiten lassen weitere Studien bezüglich der Aktivität dieser Derivate erwarten.

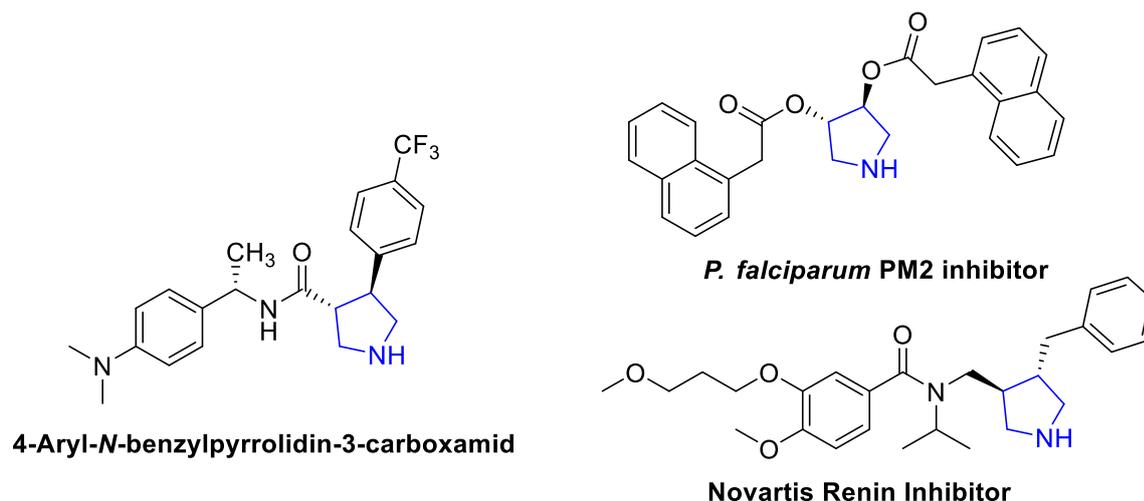
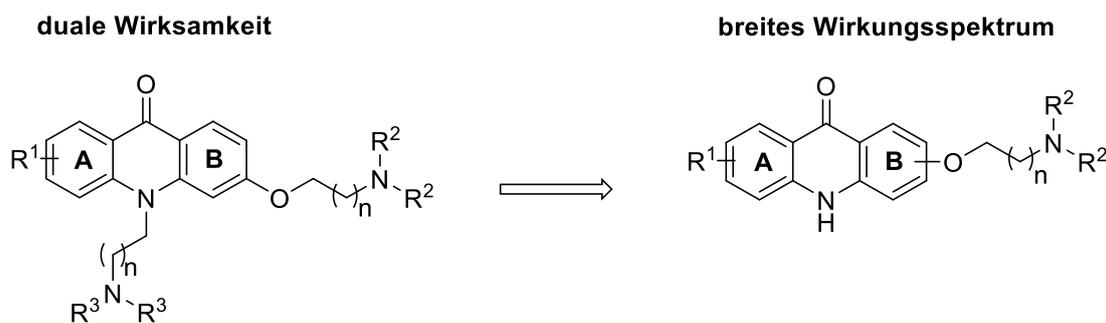


Abbildung 5: Struktur des 4-Aryl-N-benzylpyrrolidin-3-carboxamids als hochpotenten Antimalaria-Wirkstoffes im Vergleich zu den bekannten Inhibitoren der Aspartatproteasen.

In den Studien von Dodean *et al.* wurde die inhibitorische Aktivität von Acridon-basierten Verbindungen gegenüber dem Malariaparasiten im Leber- und Blutstadium charakterisiert und auf den Wirkungsursprung untersucht<sup>56</sup>. Die Effektivität der hochpotenten Leitstruktur, die von der Gruppe bereits beschrieben wurde<sup>57</sup>, wurde mittels intensiver Derivatisierung gesteigert (Abbildung 6). Die inhibitorischen Konzentrationen der Derivate wurden bis in den picomolaren Bereich herabgesetzt. Die Resistenzen mehrerer *Pf*-Stämme wurden ebenfalls umgangen. An einem mit *P. berghei*-infizierten Mausmodell konnte die Gruppe einen kurativen und sogar einen infekti-onspräventiven Effekt der Inhibitoren *in vivo* demonstrieren. Die Studie verdeutlicht das Potential der Aktivitätsverbesserung der bekannten Leitstruktur durch geeignete Modifikationen.



**Abbildung 6: Übergang von Acridon-Molekülen mit dualer Wirksamkeit zu den Acridon-Molekülen mit einem breiten Spektrum der Wirksamkeit auf den Malariaerreger.**

Findung solcher strukturellen Modifikationen hat eine hohe Relevanz in der Forschung und kann durch Ermittlung des Wirkungsursprunges rationalisiert werden. Den Wirkungsursprung der Acridone postuliert die Gruppe im Cytochrom-B-System. Dies wurde anhand der Methode der *in vitro* Resistenzselektion unter Verwendung des in Anwesenheit geringer Konzentrationen eines Acridondervates kultivierten *Pf*3D7-Stammes und der dabei entstandenen genetischen Mutationen abgeleitet. Die Methode wird zunehmend verwendet und stellt eine vielversprechende indirekte Ermittlung potentieller Wirkmechanismen zur Aufdeckung neuer Zielproteine dar<sup>58</sup>.

Eine ähnliche Methode zur Ermittlung des Wirkortes wurde in den Studien von Paquet *et al.* verwendet. Die parasitäre Phosphatidylinositol-4-Kinase wurde hierbei als das Zielsystem der 2-Aminopyridine ermittelt<sup>59</sup>. Die Wirksamkeit des Derivates MMV390048 wurde in allen humanen Stadien des Parasiten nachgewiesen. Im durch *P. berghei* infizierten Mausmodell wurde ebenfalls ein eindämmender Effekt auf die Wirt-Wirt-Übertragung der Infektion festgestellt. Die *in vivo*-Studien wurden auf ein Affenmodell übertragen, um den Effekt auf die Neuinfiltration des Wirtes durch die *P. cynomolgi*-Hypnozoite (Ruhestadium) zu prüfen. Die Eliminierung der Hypnozoite wurde nicht erreicht, allerdings konnte ein verzögernder Effekt auf die Neuinfiltration gezeigt werden.

In den Studien von Dodean *et al.* und Paquet *et al.* wurden die Wirkorte der potentiellen Inhibitorenmolekülen erst nach dem Ermitteln des Antimalaria-Effektes bestimmt. Es existieren ebenfalls bekannte Proteinsysteme, die als potentielle Targets beschrieben werden. Das *Pf* Hsp90-Chaperon wurde in diversen Studien als ein potentielles Zielprotein zur Eindämmung der parasitären Entwicklung beschrieben<sup>60-63</sup>. In den Studien von Murillo-Solano *et al.* wurden in diesem Zusammenhang bekannte Krebstherapeutika (Ansamycine, Benzamide, Resorzinole und Purine) auf deren inhibierende Aktivität gegenüber Chloroquin-sensitiven und -resistenten Stämmen getestet<sup>64</sup>. Die inhibitorischen Effekte der Verbindungen wurden im unteren

und mittleren nanomolaren Bereich quantifiziert. Für die Derivate des Resorzimols und des Ansamycines wurden zytozide Aktivitäten gegenüber den parasitären Zellen nachgewiesen. Es wurden hierbei keine *in vivo*-Untersuchungen des Effektes durchgeführt.

Untersuchungen der *in vivo* kurativen Effekte der bekannten Medikamente, die noch keinen Einsatz in der Malariatherapie gefunden haben, können die Studien effizienter gestalten. Kumarihamy *et al.* zeigten, dass die Sekundärmetabolite der bekannten Cytochalasin-Familie eine hemmende Aktivität gegenüber Pf-Stämmen D6 und W2 aufweisen (Abbildung 7)<sup>65</sup>. Die IC<sub>50</sub>-Werte der Substanzen lagen im niederen nanomolaren Bereich und waren mit denen des Chloroquin und des Artemisinin vergleichbar. Die *in vivo*-Experimente zeigten einen hemmenden Effekt auf die parasitäre Proliferation, wobei allerdings eine toxische Aktivität gegenüber dem Tierorganismus festgestellt wurde.

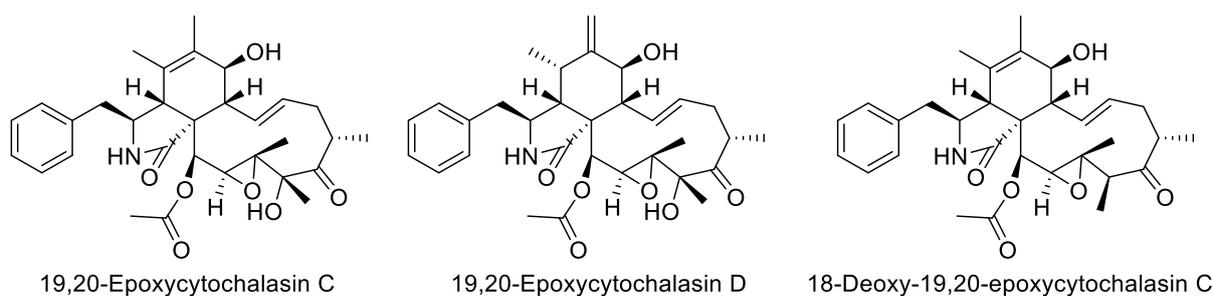


Abbildung 7: Cytochalasinderivate aus der Studie von Kumarihamy *et al.*<sup>65</sup>.

Seit dem Bericht von Burger *et al.* über die Inhibitoren der *Pf*-Spermidinsynthese, geriet das ebenfalls bereits beschriebene *Pf* SpdS-System als neuartiges Target zur Inhibierung der Malariainfektion immer mehr in den Fokus von Forschergruppen<sup>66–70</sup>. El Bessati *et al.* berichten über die Thioharnstoff- und Harnstoff-basierte synthetische Polyamine, die die antiparasitäre Aktivität gegenüber den Standard- und Resistenzstämmen des *Pf* sowohl *in vitro* als auch *in vivo* aufweisen<sup>70</sup>. Die Konzentrationen von Spermidinen und Sperminen wurden im Assay der Studie signifikant herabgesetzt, wodurch die Gruppe die Inhibierung der parasitären Spermidinsynthese als den Ursprung des anti-Malaria-Effektes vermutete.

Einen weiteren bekannten allerdings bisher wenig angegriffenen Punkt stellt der Zusammenhang zwischen dem zyklischen Proliferationsrhythmus des Parasiten im menschlichen Wirt und dem Hormon Melatonin dar<sup>71–73</sup>. Luthra *et al.* zeigten eine Hemmung der parasitären Proliferation durch die Inhibierung des Melatoninrezeptors von *P. falciparum* mittels Verbindungen auf der Basis des Indols als Leitstruktur<sup>74</sup>. In

den Effektivitätsuntersuchungen mit den *Pf-Stämmen* 3D7 und RKL9 wurden parasitäre Trophozoiten in der Weiterentwicklung gehemmt. Die erhöhte Affinität der Indol-derivate gegenüber dem menschlichen MT1-Rezeptor, die mit den *in silico* Kalkulationen in guter Korrelation steht, wurde durch die Gruppe als Verifizierung des Effektes auf das parasitäre Melatoninrezeptor gedeutet.

Die Berichte der letzten Jahre deuten auf Aktivität in der Erforschung von neuen Ansätzen zur Malariabekämpfung. Es werden sowohl Proteine des Malariaparasiten aufgedeckt und tiefgründig erforscht als auch neuartige Inhibitormoleküle mit einem hohen Potential präsentiert. Die Leitstrukturen der bereits bekannten Wirkstoffe werden ebenfalls optimiert, um ihre Effektivität und die Wirkungsbreite auf den Parasiten in allen Stadien seines Lebenszykluses zu erweitern.

## 2 Zielsetzung

Malaria wird immer noch als eine Infektionskrankheit mit dem höchsten Gefahrenpotential für das Leben des Infizierten eingestuft. Der Bedarf an neuen kurativen Ansätzen und Wirkstoffen wird durch das häufige Auftreten von Resistenz- und Multi-resistenzfällen gegen die aktuell verwendeten Medikamente verdeutlicht.

Das Motorprotein Myosin A ist als Teil des Akto-Myosin-Systems das zentrale Protein in der Krafterzeugung des parasitären Glideosom, welches dem Parasiten die überlebenswichtigen Bewegungs- und Invasionsprozesse in allen Entwicklungsstadien ermöglicht. Vorherige Studien zur Entwicklung von Inhibitoren auf der Basis von kleinen organischen Molekülen von Preller *et al.* zeigten, dass ein biarylisches Grundgerüst eine geeignete Leitstruktur zur Inhibierung des parasitären Myosins und des Invasionsverhaltens von *Plasmodium falciparum* darstellt<sup>75</sup>. In dieser Arbeit wird eine gezielte *ortho*-Funktionalisierung des biarylischen Grundgerüsts durchgeführt, um die Affinität der Struktur zum parasitären Myosin A zu erhöhen. Zur Ausarbeitung der Modifikationen wird der strukturbasierte Ansatz verwendet, der *in silico* Methoden wie molekulares Dockings und molekulardynamische Simulationen beinhaltet. Anhand von Veränderungen der Protein-Biaryl-Interaktionen *in silico*, die durch die eingeführten Modifikationen verursacht werden, sowie über die kalkulierten Gibbs-Energien der Protein-Biaryl-Komplexe wird die Affinität des jeweiligen Biarylderivates zum Zielprotein abgeschätzt.

Für den Zugang zum biarylischen Grundkörper wird eine einfache und effektive synthetische Methode etabliert. Aufgrund der axialen Chiralität der biarylischen Verbindungen werden initiale Bedingungen der asymmetrischen hydrolytischen Esterspaltung durch eine Serie von Lipasen erarbeitet, um einen potentiellen Zugang zu enantiomerenreinen Verbindungen ohne Zuhilfenahme von chiralen Katalysatoren oder Auxiliaren zu ermöglichen.

Die Affinität sowie die inhibitorische Aktivität gegenüber Myosin A seitens der synthetisierten Biarylderivate werden experimentell in den *in vitro* ATPase- und MST-Experimenten an einem Myosin A-Modell bestimmt. Um den Effekt auf das parasitäre Glideosom zu prüfen, werden zelluläre Assay mit den nicht-resistenten und multiresistenten *Pf*-Stämmen 3D7 und 7G8 im Blutstadium in der Gegenwart der Biarylderivate durchgeführt. Für die Einschränkung des potentiellen Mechanismus des inhibitorischen Effektes von Biarylen werden Flashphotolyse-Experimente verwendet, die Untersuchungen des ATPase-Zyklus des Akto-Myosin-Komplexes ermöglichen.

Eine schlechte Zugänglichkeit oder die unzureichende Stabilität von Proteinen stellt eine Limitierung bei *in vitro* Untersuchungen von Effekten der Kleinmoleküle dar. Strukturbasierter Ansatz und moderne *in silico* Methoden können bei Abwesenheit des isolierten Proteins hilfreiche Erkenntnisse liefern. Dieser Ansatz wird hier zur Ergründung von potentiellen Hintergründen einer selektiven Inhibierung von Myosin-9b durch ein mehrfach halogeniertes Carbazolderivat (DBC) angewendet. Die selektive Inhibierung wurde in den Studien der Gruppe um Prof. Tsiavaliaris festgestellt. Das Myosin wird mit ösophagealem Adenokarzinom und Lungenkrebsprogression sowie mit Metastasierung vom Krebs in Verbindung gebracht. DBC als spezifischer Inhibitor des Myosin-9b kann somit als ein potentieller Modulator der Tumorproliferation für zelluläre Experimente und Krebsmodelle eingesetzt werden.

## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Chemische Synthesen

#### 3.1.1 Allgemeine Hinweise und Methoden

##### **Apparatur**

Reaktionen unter Verwendung von luft- und feuchtigkeitsempfindlichen Reagenzien oder Produkten wurden in einem zuvor unter Vakuum ausgeheiztem Glaskolben, sowie in Inertgasatmosphäre (Stickstoff oder Argon) durchgeführt. Die zum Transfer der Lösungsmittel und Reagenzien verwendeten Spritzen und Kanülen wurden zuvor mehrmals mit Inertgas gespült.

##### **Reagenzien und Lösungsmittel**

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle kommerziell erworbenen Reagenzien ohne zusätzliches Vorbehandeln (Trocknung, Reinigung) in der gelieferten Qualität verwendet. Trockene Lösungsmittel für die Reaktionen unter Verwendung von luft- und feuchtigkeitsempfindlichen Reagenzien wurden unmittelbar vor der Verwendung mindestens zwei Stunden mit Inertgas begast.

Die zur Aufarbeitung der Reaktionen verwendeten wässrigen Lösungen sind sofern nicht anders angegeben gesättigte Salzlösungen. Die Aufarbeitung der organischen Phasen nach der Extraktion wurde unter Verwendung von wasserfreiem Magnesium- oder Natriumsulfat durchgeführt.

##### **Produktreinigung**

Säulenchromatographische Reinigung der erhaltenen Zwischen- und Endprodukte wurde mit Kieselgel der Firma MACHEREY-NAGEL (Korngröße 40-63  $\mu\text{m}$ ) bei leichtem Überdruck durchgeführt. Die Eluentenverhältnisse sind in der jeweiligen Versuchsvorschrift angegeben.

Einige der erhaltenen Zwischen- und Endprodukte wurden an der präparativen Anlage der Firma BÜCHI (*BÜCHI REVELERIS PREP*) unter Verwendung kommerziell verfügbaren Säulenkartuschen, die mit Kieselgel gefüllt sind, gereinigt. Die Dimension der Kartusche, sowie Eluentenverhältnisse und der Gradient sind für das jeweilige Produkt in der Synthesevorschrift angegeben. Der verwendete Petrolether wurde in technischer Qualität erworben und einfach destilliert. Alle anderen verwendeten Lösungsmittel wurden in HPLC-Qualität kommerziell erworben.

Dünnschichtchromatographie wurde unter Verwendung von mit Kieselgel 60 beschichteten Aluminiumfolien der Firma MACHEREY-NAGEL durchgeführt. Die Analy-

se erfolgte unter UV-Licht bei 254 nm. Zum Färben der aufgetragenen Produkte wurden Kaliumpermanganat-, Bromkresolgrün- und Anisaldehydlösungen als Färbereagenzien verwendet.

### NMR-Spektroskopie

Die  $^1\text{H}$ -NMR-Analyse erfolgte mit den Geräten AVS-400 (400 MHz) und DPX-400 (400 MHz) der Firma BRUKER bei 25 °C. Die verwendeten deuterierten Lösungsmittel sind in den Vorschriften angegeben. Die Normierung der Spektren erfolgte anhand des Restprotonensignals des Lösungsmittels. Bei der Beschreibung der Multiplizitäten der Signale werden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, sept = Septett, m = Multiplett und brs = breites Singulett. Die Kopplungskonstanten  $J$  sind in der Einheit Hertz (Hz) angegeben.

Die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden mit den Geräten AVS-400 (100 MHz) und DPX-400 (100 MHz) der Firma BRUKER bei 25 °C aufgenommen. Die Normierung der Spektren erfolgte anhand des Lösungsmittelsignals. Für die Beschreibung der Signale werden folgende Abkürzungen verwendet: p = primär, s = sekundär, t = tertiär und q = quartär.

Für die vollständige Interpretation wurden  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -Korrelationsspektren (COSY) und  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren (HMBC, HSQC) zur Hilfe herangezogen. Die Spektren wurden im Programm *TopSpin* der Firma BRUKER prozessiert.

### Massenspektrometrie

Hochaufgelöste Massenspektren (HRMS) wurden mit einer MICROMASS LCT mit LockSpray-Einheit gemessen. Die Injektion erfolgte im Loop-Modus in einer HPLC-Anlage der Firma WATERS (Alliance 2695). Alternativ erfolgte die Messung mit einer MICROMASS Q-TOF in Verbindung mit einer WATERS Aquity UPLC-Anlage. Die Ionisierung erfolgte durch Elektronensprayionisation (ESI). In jeweiliger Versuchsvorschrift sind die berechnete und die gefundene Masse angegeben.

## 3.1.2 Synthesvorschriften

### Vorschrift für die *one-pot* SUZUKI-MIYAJURA-Kreuzkupplung

Das halogenierte Substrat I (1 Äq.) wird mit dem Katalysator XPhos-Pd-GII (0.01 Äq.), dem Liganden XPhos (0.02 Äq.), dem Tetrahydroxydiboron (3 Äq.) und der Base Kaliumacetat (3 Äq.) im Kolben vorgelegt und in vorher entgastem, trockenem Ethanol gelöst. Die Lösung wird unter Ar-Atmosphäre auf 80 °C erwärmt und bis zur intensiven Gelb- bzw. Braunfärbung gerührt (etwa 30 min), auf RT abgekühlt. Die

stärkere Base Kaliumkarbonat (3 Äq.), sowie das halogenierte Substrat II (1 Äq.) werden hinzugefügt. Die Lösung wird erneut auf 80 °C erwärmt, 12 h gerührt und nach dem Abkühlen durch Kieselgel filtriert sowie mit Ethylacetat gewaschen. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt gereinigt.

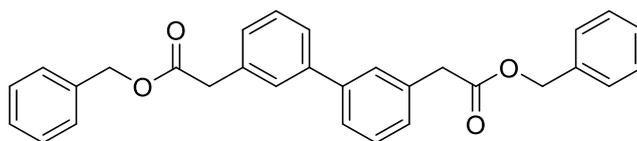
### **Vorschrift für die Umesterungsreaktion**

Dimethyl- bzw. Diethylbiphenyldiacetate werden über die Reaktionsfolge aus Verseifung und nachfolgender Benzylierung in die gewünschten Dibenzylbiphenyldiacetate überführt. Der Methyl/Ethylester (1 Äq.) wird mit LiOH·H<sub>2</sub>O (5 Äq.) im Kolben vorgelegt und in einem H<sub>2</sub>O/THF-Gemisch (1:1) gelöst. Die Reaktionslösung wird 2 h bei RT gerührt und mit Salzsäure (1M) angesäuert. EtOAc wird hinzugefügt, die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase wird fünffach mit EtOAc extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und die Reste in Acetonitril (ca. 10 mL) aufgenommen. Die Lösung wird mit 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (2 Äq.), sowie mit Benzylbromid (3 Äq.) versetzt und 20 h bei 85 °C gerührt. Die Lösung wird mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung neutralisiert und mit EtOAc dreifach extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt gereinigt.

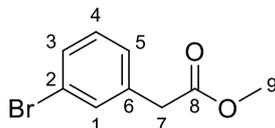
### **Vorschrift für die FeCl<sub>3</sub>-vermittelte oxidative Biarylkupplung**

SiO<sub>2</sub> (3.9 g, 0.06 mol) wird 15 h bei 80 °C im Trockenofen getrocknet. FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (1.8 g, 6.7 mmol), sowie Diethylether:Methanol (20 mL, 95:5) werden hinzugefügt. Die Suspension wird 1 h bei RT im Dunklen gerührt und das Lösungsmittel entfernt. Das trockene Gemisch wird 12 h bei 80 °C und Hochvakuum unter Ausschluss von Licht gerührt. Das Edukt wird in trockenem und vorher entgastem Methylenchlorid gelöst und dem Gemisch hinzugefügt. Die Suspension wird 2 h bei RT gerührt und das Lösungsmittel erneut unter vermindertem Druck entfernt. Das Gemisch wird 72 h bei 60 °C und Hochvakuum unter Ausschluss von Licht gerührt und mit EtOAc versetzt, durch Celite<sup>®</sup> filtriert sowie mit 20 mL EtOAc gewaschen. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt gereinigt.

### 3.1.2.1 Dibenzyl-2,2'-([1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (7)



### Methyl-2-(3-bromophenyl)acetat (1)

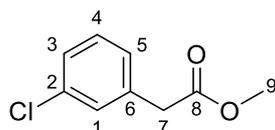


2-(3-Bromophenyl)essigsäure (**2**, 250 mg, 1.17 mmol, 1 Äq.) wurde in Methanol gelöst, mit konzentrierter Salzsäure (37%, MeOH:HCl = 7:1) versetzt und 20 h bei 90 °C gerührt. Das Volumen der Lösung wurde reduziert und mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung sowie NaOH-Lösung (2M) wurde der pH-Wert auf 10 eingestellt. Die organische Phase wurde abgetrennt und erneut mit wenig NaOH-Lösung (1M) gewaschen. Die wässrige Phase wurde dreifach mit EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen erneut mit NaOH-Lösung (1M) zweifach gewaschen. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Die säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 4:1) ergab das Produkt **1** (255 mg, 1.12 mmol, 96%) als hellgelbes Öl.

Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur beschriebenen überein<sup>76</sup>.

**R<sub>f</sub>** = 0.47 (PE:EtOAc = 4:1); **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): 7.44 (1H, m, H-1), 7.42-7.39 (1H, td, *J* = 6.7 Hz, 2.2 Hz, H-3), 7.23-7.17 (2H, m, H-4,5), 3.71 (3H, s, H-9), 3.60 (2H, s, H-7) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm): 171.3 (q, C-8), 136.0 (q, C-2), 132.3 (t, C-1), 130.3 (t, C-4/5), 130.1 (t, C-3), 127.9 (t, C-4/5), 122.5 (q, C-6), 52.2 (p, C-9), 40.7 (s, C-7) ppm.

### Methyl-2-(3-chlorophenyl)acetat (3)

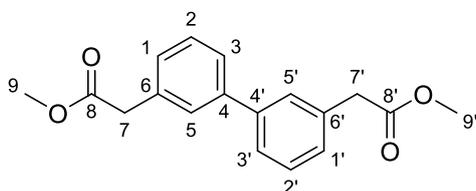


Die Darstellung erfolgte ausgehend von 2-(3-Chlorophenyl)essigsäure (**4**, 125 mg, 0.73 mmol, 1 Äq.) nach der Vorschrift zur Synthese des entsprechenden Bromophenylacetats **1**. Die säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 4:1) ergab das Produkt **3** (124 mg, 0.67 mmol, 92%) als ein hellgelbes Öl.

Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur beschriebenen überein<sup>77</sup>.

$R_f = 0.44$  (PE:EtOAc = 4:1);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7.26$  ppm): 7.44 (1H, m, H-1), 7.42-7.39 (1H, td,  $J = 6.7$  Hz, 2.2 Hz, H-3), 7.23-7.17 (2H, m, H-4,5), 3.70 (3H, s, H-9), 3.60 (2H, s, H-7) ppm.  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm): 171.3 (q, C-8), 136.0 (q, C-2), 132.3 (t, C-1), 131.0 (t, C-4/5), 130.1 (t, C-3), 128.4 (t, C-4/5), 122.5 (q, C-6), 52.2 (p, C-9), 40.7 (s, C-7) ppm.

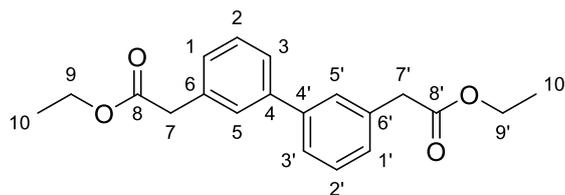
### Dimethyl-2,2'-([1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (**5**)



Die Darstellung erfolgte nach der Vorschrift für die *one-pot* SUZUKI-MIYAUURA-Kupplung. Die Reihenfolge der halogenierten Phenylacetate **1** und **3** wurde variiert: **A**) Bromphenylacetat **1** (50 mg, 0.22 mmol, 1 Äq.) wurde in beiden Stufen der Synthese eingesetzt; **B**) Das Bromphenylacetat **1** (50 mg, 0.22 mmol, 1 Äq.) und das Chlorphenylacetat **3** (41 mg, 0.22 mmol, 1 Äq.) wurden jeweils als Substrat I und II verwendet; **C**) Das Chlorphenylacetat **3** (50 mg, 0.27 mmol, 1 Äq.) und das Bromphenylacetat **1** (61.6 mg, 0.27 mmol, 1 Äq.) wurden jeweils als Substrat I und II verwendet. Die säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 9:1 → 2:1) ergab den biphenylischen Methylester **5** (**A**): 33 mg, 0.11 mmol, 50%; **B**): 33.0 mg, 0.11 mmol, 50%; **C**): 71.8 mg, 0.24 mmol, 90%) als hellgelbes, viskoses Öl.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7.26$  ppm): 7.51-7.48 (4H, m, H-2,2',3,3'), 7.42-7.38 (2H, m, H-1,1'), 7.29-7.27 (2H, m, H-5,5'), 3.71 (6H, s, H-9,9'), 3.70 (4H, s, H-7,7') ppm.  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm): 171.9 (q, C-8,8'), 141.3 (q, C-6,6'), 134.4 (q, C-4,4'), 129.0 (t, C-1,1'), 128.2 (t, C-2,2'/3,3'), 128.2 (t, C-5,5'), 126.0 (t, C-2,2'/3,3'), 52.1 (p, C-9,9'), 41.2 (s, C-7,7') ppm. **ESI-MS**: ges.  $[\text{M}+\text{Na}^+] = 321.1097$ , gef.  $[\text{M}+\text{Na}^+] = 321.1103$ .

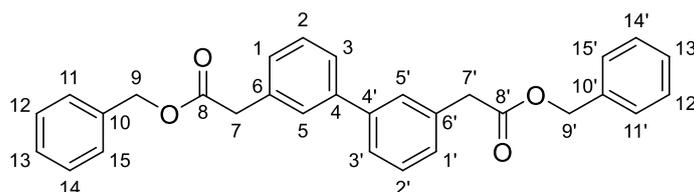
### Diethyl-2,2'-([1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (6)



Die Darstellung erfolgte nach der Vorschrift für die *one-pot* SUZUKI-MIYAURA-Kupplung. Das Chlorphenylacetat **3** (50.0 mg, 0.27 mmol, 1 Äq.) und das Bromphenylacetat **1** (61.6 mg, 0.27 mmol, 1 Äq.) wurden jeweils als Substrat I und II verwendet. Um die Umesterungsreaktion herbeizuführen, wurde die Menge der stärkeren Base  $K_2CO_3$  im zweiten Schritt der SUZUKI-MIYAURA-Kupplung von 3 Äq. auf 5 Äq. erhöht. Die säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 9:1 → 5:1) ergab den Diethylester **6** (30 mg, 0.09 mmol, 34%) als hellgelbes, viskoses Öl.

$R_f = 0.64$  (PE:EtOAc = 5:1);  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ,  $CHCl_3 = 7.26$  ppm): 7.51-7.48 (4H, m, H-1,1',3,3'), 7.42-7.38 (2H, t,  $J = 7.8$  Hz, H-5,5'), 7.30-7.27 (2H, td,  $J = 7.7$  Hz, 1.3 Hz, H-2,2'), 4.20-4.15 (4H, q,  $J = 7.2$  Hz, H-9,9'), 3.68 (4H, s, H-7,7'), 1.29-1.25 (6H, t,  $J = 7.1$  Hz, H-10,10') ppm.  $^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ,  $CHCl_3 = 77.0$  ppm): 171.5 (q, C-8,8'), 141.2 (q, C-4,4'), 134.6 (q, C-6,6'), 128.9 (t, C-5,5'), 128.2 (t, C-1,1'/3,3'), 128.1 (t, C-2,2'), 125.9 (t, C-1,1'/3,3'), 60.9 (s, C-9,9'), 41.4 (s, C-7,7'), 14.2 (p, C-10,10') ppm. **ESI-MS**: ges.  $[M+H]^+$  = 327.1591, gef.  $[M+H]^+$  = 327.1619.

### Dibenzyl-2,2'-([1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (7)

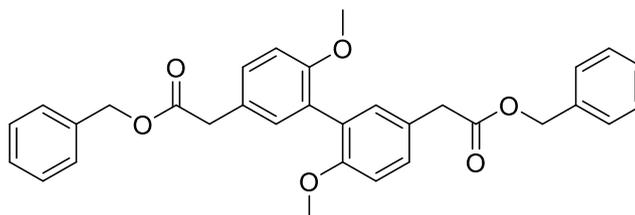


**Variante I:** Die Darstellung erfolgte nach der Vorschrift für die Benzylierungsreaktion ausgehend vom Diacetat **5** (43.5 mg, 0.15 mmol, 1 Äq.). **Variante II:** Die Darstellung erfolgte nach der Vorschrift für die *one-pot* SUZUKI-MIYAURA-Kupplung mit der direkten Umesterung zum Dibenzylester. Das Bromphenylacetat **1** (50.0 mg, 0.22 mmol, 1 Äq.) wurde als Substrat I und II eingesetzt. Die Reinigung (REVELERISPREP; Kartusche: Reveleris<sup>®</sup> HP Si 12 g; Flussrate: 20 mL/min; PE:EtOAc; Gradient: 0-10 min 0% EtOAc, 10-12 min 0-5% EtOAc, 12-22 min 5% EtOAc, 22-23 min 5-10% EtOAc, 23-25.5 min 10% EtOAc, 23.5-26.5 min 10-30% EtOAc, 26.5-28 min 30% EtOAc, 28-29 min 30-50% EtOAc, 29-31 min 50% EtOAc) ergab den biphenyli-

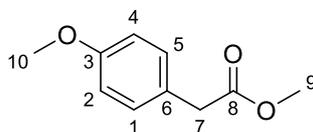
schen Benzylester **7** (**I**: 29.0 mg, 0.06 mmol, 48%; **II**: 22.3 mg, 0.05 mmol, 23% über 4 Stufen) als hellgelbes, viskoses Öl.

$R_f = 0.45$  (PE:EtOAc = 6:1);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7.26$  ppm): 7.48-7.45 (4H, m, H-2',3,3'), 7.40-7.36 (2H, m, H-1,1'), 7.34-7.30 (10H, m, H-11-15,11'-15'), 7.29-7.26 (2H, m, H-5,5'), 5.15 (4H, s, H-9,9'), 3.73 (4H, s, H-7,7') ppm.  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm): 171.7 (q, C-8,8'), 142.3 (q, C-4,4'), 137.2 (q, C-10,10'), 136.4 (q, C-6,6'), 132.3 (t, C-1,1'), 129.4 (, C-5,5'), 128.3 (t, C-12,14,12'-14'), 128.1 (t, C-11,15,11'-15'), 127.6 (t, C-2,2'), 125.6 (t, C-13,13'), 120.3 (t, C-3,3'), 66.5 (s, C-9,9'), 40.4 (s, C-7,7') ppm. **ESI-MS**: ges.  $[\text{M}+\text{Na}^+] = 473.1729$ , gef.  $[\text{M}+\text{Na}^+] = 473.1725$ .

### 3.1.2.2 Dibenzyl-2,2'-(6,6'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (**17**)



### Methyl-2-(4-methoxyphenyl)acetat (**8**)



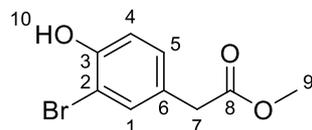
Methyl-2-(4-hydroxyphenyl)acetat (**9**, 500 mg, 3.01 mmol, 1 Äq.) wurde in Aceton gelöst und mit  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (582 mg, 4.21 mmol, 1.4 Äq) versetzt. Die Lösung wurde nach der Zugabe von Methyljodid (640 mg, 4.52 mmol 1.5 Äq.) 12 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Methylenchlorid aufgenommen und mit Wasser versetzt. Die Phasen wurden getrennt und die organische mit drei Portionen 2M NaOH-Lösung gewaschen. Die vereinten wässrigen Phasen wurden mit Methylenchlorid einfach extrahiert und die vereinten organischen Phasen über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt **8** (320 mg, 2.5 mmol, 85%) wurde als farbloses Öl erhalten.

Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur beschriebenen überein<sup>78</sup>.

$R_f = 0.34$  (Methylenchlorid);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7.26$  ppm): 7.21-7.19 (2H, m, H-2,4), 6.87-6.85 (2H, m, H-1,5), 3.79 (3H, s, H-9), 3.69 (3H, s, H-10), 3.57

(2H, s, H-7) ppm.  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm): 172.3 (q, C-8), 158.7 (q, C-3), 130.3 (t, C-2,4), 126.0 (q, C-6), 114.0 (t, C-1,5), 55.2 (p, C-9), 52.0 (p, C-10), 40.3 (s, C-7) ppm. **ESI-MS:** ges.  $[\text{M}+\text{Na}^+] = 203.0679$ , gef.  $[\text{M}+\text{Na}^+] = 203.0677$ .

### Methyl-2-(3-bromo-4-hydroxyphenyl)acetat (**10**)

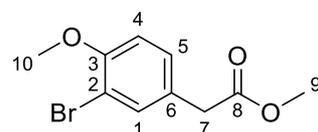


Methyl-2-(4-hydroxyphenyl)acetat (**9**, 1.00 g, 6.02 mmol, 1 Äq.) wurde in Essigsäure (17 mL) gelöst und  $\text{Br}_2$ -Lösung (0.5 M in Essigsäure, 1 g, 6.32 mmol, 1.05 Äq.) wurde der Stammlösung über 1 h bei RT zugetropft. Die Lösung wurde weitere 1.5 h bei RT gerührt und mit  $\text{NaHSO}_3$ -Lösung versetzt. Das Lösungsmittel wurde destillativ entfernt ( $T_b=110$  °C). Die säulenchromatographische Reinigung (Methylenchlorid) ergab das Produkt **10** (1.38 g, 5.66 mmol, 94%) als farbloses Öl.

Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur beschriebenen überein<sup>79</sup>.

$R_f = 0.22$  (PE:EtOAc = 5:1);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7.26$  ppm): 7.40-7.39 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-1), 7.16-7.10 (1H, dd,  $J = 2.1$  Hz, 8.4 Hz, H-5), 6.98-6.94 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz, H-4), 5.49 (1H, s, H-10), 3.70 (3H, s, H-9), 3.54 (2H, s, H-7) ppm.  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm): 171.8 (q, C-8), 155.0 (t, C-2), 133.8 (t, C-1), 129.3 (t, C-5), 128.3 (q, C-3), 111.9 (q, C-6), 111.6 (q, C-4), 52.1 (p, C-9), 39.8 (s, C-7) ppm. **ESI-MS:** ges.  $[\text{M}+\text{H}^+] = 244.9813$ , gef.  $[\text{M}+\text{H}^+] = 244.9712$ .

### Methyl-2-(3-bromo-4-methoxyphenyl)acetat (**11**)



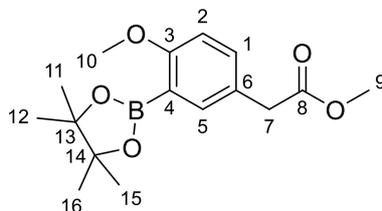
**Variante I:** Das Hydroxyphenylacetat **10** (500 mg, 2.13 mmol, 1 Äq.) wurde in Aceton gelöst und mit  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (353 mg, 2.56 mmol, 1.2 Äq) versetzt. Die Lösung wurde nach Zugabe von Methyljodid (393 mg, 2.77 mmol 1.3 Äq.) 12 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser beendet. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige mit Methylenchlorid dreifach extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck

entfernt. **Variante II:** Methyl-2-(4-hydroxyphenyl)acetat (**9**, 200 mg, 1.2 mmol, 1 Äq.) wurde in Essigsäure (3.5 mL) gelöst und Br<sub>2</sub>-Lösung (0.5 M in Essigsäure, 198 mg, 1.26 mmol, 1.05 Äq.) wurde der Stammlösung über 1 h bei RT zugetropft. Die Lösung wurde weitere 1.5 h bei RT gerührt und mit NaHSO<sub>3</sub>-Lösung versetzt. Das Lösungsmittel wurde destillativ entfernt ( $T_b=110$  °C). Der Rückstand wurde in Aceton aufgenommen und mit K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (199 mg, 1.44 mmol, 1.2 Äq) versetzt. Die Lösung wurde nach Zugabe von Methyljodid (227 mg, 1.6 mmol 1.3 Äq.) 12 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser beendet. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit Methylenchlorid dreifach extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 5:1) ergab das Produkt **11** (**I**: 521 mg, 2.02 mmol, 95%; **II**: 260 mg, 1.01 mmol, 84% über zwei Stufen) als einen farblosen Feststoff.

Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur beschriebenen überein<sup>79</sup>.

$R_f$  = 0.30 (PE:EtOAc = 5:1); **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): 7.47-7.46 (1H, d,  $J$  = 2.1 Hz, H-1), 7.21-7.16 (1H, dd,  $J$  = 2.2 Hz, 8.4 Hz, H-5), 6.87-6.83 (1H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-4), 3.88 (3H, s, H-10), 3.69 (3H, s, H-9), 3.54 (2H, s, H-7) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm): 171.8 (q, C-8), 155.0 (t, C-2), 134.0 (t, C-1), 129.3 (t, C-5), 127.4 (q, C-3), 111.9 (q, C-6), 111.6 (q, C-4), 56.2 (p, C-10), 52.1 (p, C-9), 39.8 (s, C-7) ppm. **ESI-MS:** ges. [M+H<sup>+</sup>] = 258.9964, gef. [M+H<sup>+</sup>] = 258.9862.

### Methyl-2-(4-methoxy-3-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)acetat (**12**)



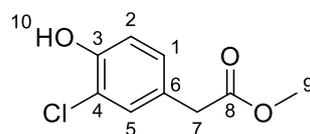
Das Methoxyphenylacetat **13** (100 mg, 0.39 mmol, 1 Äq.), PdCl<sub>2</sub>(dppf) (15.8 mg, 0.02 mmol, 0.05 Äq.), Bis(pinacolato)diboron (147 mg, 0.58 mmol, 1.5 Äq.) und KOAc (114 mg, 1.16 mmol, 3 Äq.) wurden in trockenem, vorher entgasten 1,2-Dimethoxyethan (7 mL) gelöst. Die Lösung wurde 18 h bei 110 °C gerührt. Nach

dem Abkühlen wurden Wasser und EtOAc hinzugefügt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde dreifach mit EtOAc extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 3:1) ergab das Produkt **12** (72.7 mg, 0.24 mmol, 61%) als hellgelbes Öl.

Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur beschriebenen überein<sup>80</sup>.

$R_f = 0.43$  (PE:EtOAc = 3:1);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7.26$  ppm): 7.55-7.54 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-5), 7.33-7.30 (1H, dd,  $J = 8.5$  Hz, 2.4 Hz, H-1), 6.83-6.81 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-2), 3.81 (3H, s, H-10), 3.67 (3H, s, H-9), 3.56 (2H, s, H-7), 1.34 (12H, s, H-11,12,15,16) ppm.  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm): 171.7 (q, C-8), 155.0 (q, C-3), 134.0 (t, C-5), 129.3 (t, C-1), 127.4 (q, C-6), 111.8 (t, C-2), 111.2 (q, C-4), 83.4 (q, C-13,14), 56.2 (p, C-10), 52.1 (p, C-9), 39.7 (s, C-7), 25.0 (p, C-11,12,16,15) ppm.

#### Methyl-2-(3-chloro-4-hydroxyphenyl)acetat (**14**)



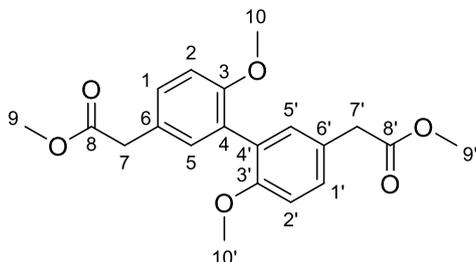
Methyl-2-(4-hydroxyphenyl)acetat (**9**, 5 g, 30.1 mmol, 1 Äq.) und *p*TsOH (11.3 g, 60.2 mmol, 2 Äq.) wurden in Acetonitril gelöst und 5 min bei RT gerührt. Die Lösung wurde nach Zugabe von NCS (4.02 g, 30.1 mmol, 1 Äq.) 3 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 mL  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung beendet. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde dreifach mit Diethylether extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung (Methylenchlorid) ergab das Produkt **14** (4.2 g, 20.9 mmol, 69%) als farblosen Feststoff.

Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur beschriebenen überein<sup>81</sup>.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7.26$  ppm): 7.27-7.26 (1H, d,  $J = 2.3$ , H-5), 7.10-7.08 (1H, dd,  $J = 8.4$  Hz, 2.3 Hz, H-1), 6.98-6.96 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-2), 5.53 (1H, brs, H-10), 3.70 (3H, s, H-9), 3.54 (2H, s, H-7) ppm.  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,

$\text{CHCl}_3 = 77.0 \text{ ppm}$ ): 171.9 (q, C-8), 150.5 (t, C-4), 129.7 (t, C-5), 129.3 (t, C-1), 127.0 (t, C-3), 119.8 (q, C-6), 116.3 (t, C-2), 52.2 (p, C-9), 39.9 (s, C-7) ppm.

### Dimethyl-2,2'-(6,6'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (**15**)



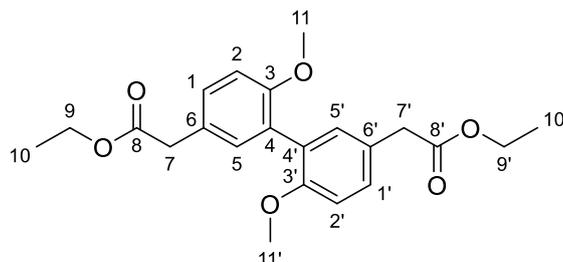
**Variante I:** Das Methoxyphenylacetat **11** (4.13 mg, 0.02 mmol, 1 Äq.), das Phenylacetat **12** (6.4 mg, 0.02 mmol, 1.3 Äq.),  $\text{NBu}_4\text{F}$  (16.7 mg, 0.06 mmol, 4 Äq.) und Pd/C (17 mg, 0.16 mmol, 8 Äq.) wurden in Wasser suspendiert. Die Suspension wurde 3 h bei 80 °C gerührt, nach dem Abkühlen mit 1M HCl-Lösung versetzt und filtriert. Das Filtrat wurde mit MTBE dreifach extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. **Variante II:** Die Synthese erfolgte nach der Vorschrift für die  $\text{FeCl}_3$ -vermittelte oxidative Kupplung. Das Methoxyphenylacetat **10** (80 mg, 0.44 mmol, 1 Äq.) wurde als Edukt eingesetzt. **Variante III:** Das Methoxyphenylacetat **10** (50 mg, 0.28 mmol, 1 Äq.) und  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (700 mg, 2.59 mmol, 9.3 Äq.) wurden im Mikrowellengefäß vorgelegt, in trockenem Methylenchlorid (3 mL) suspendiert und in Mikrowellenapparatur 1 h bei 125 °C und 13 bar Überdruck gerührt. Die Lösung wurde mit Wasser und EtOAc versetzt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige dreifach mit EtOAc extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. **Variante IV:** Die Darstellung erfolgte nach der Vorschrift für die *one-pot* SUZUKI-MIYAUURA-Kupplung. Das Methoxyphenylacetat **11** (720 mg, 2.79 mmol, 1 Äq.) wurde als Substrat I und II verwendet. Die säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 3:1) ergab das Produkt **15** (I: kein Produkt; II: 1.43 mg, 4  $\mu\text{mol}$ , 6%; III: 2.31 mg, 6  $\mu\text{mol}$ , 2%; IV: 494 mg, 1.95 mmol, 70%) als hellgelbes Öl.

Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur beschriebenen überein<sup>75</sup>.

$R_f = 0.18$  (PE:EtOAc = 4:1);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7.26 \text{ ppm}$ ): 7.26-7.23 (2H, dd,  $J = 8.7 \text{ Hz}$ , 2.2 Hz, H-1,1'), 7.15-7.14 (2H, d,  $J = 2.1 \text{ Hz}$ , H-5,5'), 6.93-6.91

(2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2,2'), 3.76 (6H, s, H-10,10'), 3.69 (6H, s, H-9,9'), 3.59 (4H, s, H-7,7') ppm.  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm): 172.4 (q, C-8,8'), 156.2 (q, C-5,5'), 132.3 (t, C-1,1'), 129.4 (q, C-6,6'), 127.5 (q, C-4,4'), 125.7 (t, C-3,3'), 111.2 (t, C-2,2'), 55.8 (p, C-10,10'), 52.0 (p, C-9,9'), 40.3 (s, C-7,7') ppm. **ESI-MS:** ges.  $[\text{M}+\text{Na}^+] = 381.1309$ , gef.  $[\text{M}+\text{H}^+] = 381.1298$ .

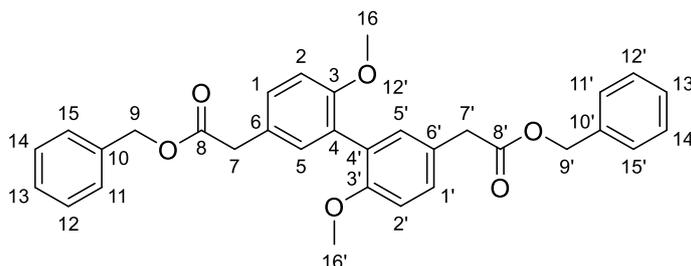
### Diethyl-2,2'-(6,6'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (16)



Die Darstellung erfolgte nach der Vorschrift für die *one-pot* SUZUKI-MIYAUURA-Kupplung. Das Methoxyphenylacetat **11** (130 mg, 0.5 mmol, 1 Äq.) wurde als Substrat I und II verwendet. Um die Umesterungsreaktion herbeizuführen, wurde die Menge von der stärkeren Base  $\text{K}_2\text{CO}_3$  im zweiten Schritt der SUZUKI-MIYAUURA-Kupplung von 3 Äq. auf 5 Äq. erhöht. Die säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 9:1  $\rightarrow$  4:1) ergab den umgeesterten Diethylester **16** (62.6 mg, 0.18 mmol, 36%) als hellgelbes, viskoses Öl.

$R_f = 0.59$  (PE:EtOAc = 4:1);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7.26$  ppm): 7.26-7.23 (2H, dd,  $J = 8.5$  Hz, 2.4 Hz, H-1,1'), 7.15-7.14 (2H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-5,5'), 6.93-6.91 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-2,2'), 4.18-4.12 (4H, q,  $J = 7.2$  Hz, H-9,9'), 3.76 (6H, s, H-11,11'), 3.57 (4H, s, H-7,7'), 1.28-1.24 (6H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-10,10') ppm.  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm): 171.3 (q, C-8,8'), 154.4 (q, C-3,3'), 133.4 (t, C-5,5'), 129.6 (t, C-1,1'), 126.8 (q, C-6,6'), 112.1 (q, C-4,4'), 112.0 (t, C-2,2'), 60.8 (s, C-9,9'), 55.6 (p, C-11,11'), 40.8 (p, C-7,7'), 14.2 (p, C-10,10') ppm. **ESI-MS:** ges.  $[\text{M}+\text{Na}^+] = 409.1622$ , gef.  $[\text{M}+\text{Na}^+] = 409.1719$ .

### Dibenzyl-2,2'-(6,6'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (17)

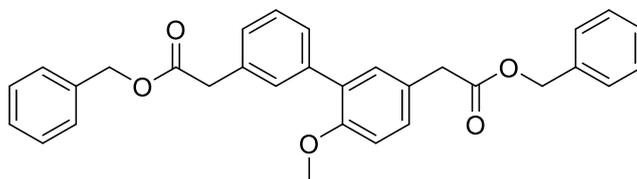


Die Darstellung erfolgte nach der Vorschrift für die Benzilylierungsreaktion ausgehend vom Diacetat **15** (94.4 mg, 0.24 mmol, 1 Äq.). Die säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 10:1 → 2:1) ergab das benzylierte Produkt **17** (77.1 mg, 0.15 mmol, 62%) als hellgelbes, viskoses Öl.

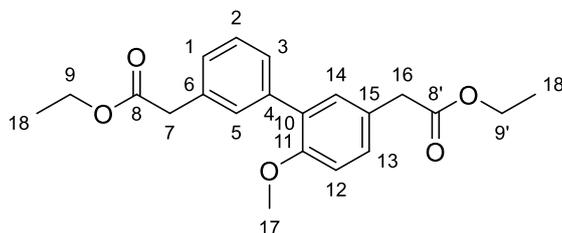
Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur beschriebenen überein<sup>75</sup>.

$R_f$  = 0.56 (PE:EtOAc = 2:1); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): 7.36-7.28 (10H, m, H-11-15, 11'-15'), 7.26-7.24 (2H, dd,  $J$  = 8.5 Hz, 2.4 Hz, H-1,1'), 7.14-7.13 (2H, d,  $J$  = 2.4 Hz, H-5,5'), 6.93-6.91 (2H, d,  $J$  = 8.5 Hz, H-2,2'), 5.14 (4H, s, H-9,9'), 3.75 (6H, s, H-16,16'), 3.63 (4H, s, H-7,7') ppm. <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm): 171.7 (q, C-8,8'), 156.2 (q, C-3,3'), 135.9 (q, C-10,10'), 132.4 (t, C-5,5'), 129.4 (t, C-1,1'), 128.5 (q, C-4,4'), 128.1 (t, C-11-15,11'-15'), 128.1 (t, C-11-15,11'-15'), 127.6 (t, C-11-15,11'-15'), 125.6 (q, C-6,6'), 111.2 (t, C-2,2'), 66.5 (s, C-9,9'), 55.8 (p, C-16,16'), 40.4 (s, C-7,7') ppm. **ESI-MS**: ges. [M+Na<sup>+</sup>] = 381.1309, gef. [M+Na<sup>+</sup>] = 381.1298.

### 3.1.2.3 Dibenzyl-2,2'-(6-methoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (**19**)



### Diethyl-2,2'-(6-methoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (**18**)

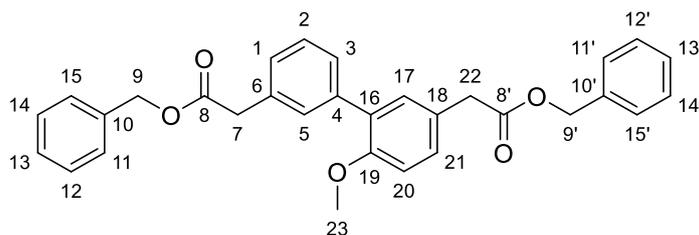


Die Darstellung erfolgte nach der Vorschrift für die *one-pot* SUZUKI-MIYAUURA-Kupplung unter Variation der eingesetzten Edukte. Die Umesterung wurde durch die Erhöhung der Menge von der stärkeren Base K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> im zweiten Schritt der SUZUKI-MIYAUURA-Kupplung von 3 Äq. auf 5 Äq. herbeigeführt. Die Eduktvariation wird in der Reihenfolge des Einsatzes in der Reaktion angegeben: **A**) Hydroxyphenylacetat **14** (50 mg, 0.25 mmol, 1 Äq.) und Bromphenylacetat **1** (56.9 mg, 0.25 mmol, 1 Äq.); **B**) Hydroxyphenylacetat **14** (50 mg, 0.25 mmol, 1 Äq.) und Chlorphenylacetat **3**

(46 mg, 0.25 mmol, 1 Äq.); **C**) Methoxyphenylacetat **10** (100 mg, 0.39 mmol, 1 Äq.) und Bromophenylacetat **3** (88.9 mg, 0.39 mmol, 1 Äq.). Die säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 9:1 → 4:1) ergab den umgeesterten Diethylester **18** (**A** und **B**: kein Produkt; **C**: 32.1 mg, 0.09 mmol, 23%).

$R_f$  = 0.64 (PE:EtOAc = 4:1);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3$  = 7.26 ppm): 7.44-7.42 (2H, m, H-14,5), 7.37-7.34 (1H, t,  $J$  = 7.8 Hz, H-2), 7.26-7.22 (3H, m, H-1,3,13), 6.94-6.92 (1H, d,  $J$  = 8.2 Hz, H-12), 4.18-4.13 (4H, q,  $J$  = 7.2 Hz, H-9,9'), 3.79 (3H, s, H-17), 3.65 (2H, s, H-7), 3.59 (2H, s, H-16), 1.28-1.24 (6H, t,  $J$  = 7.2 Hz, H-18,18') ppm.  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3$  = 77.0 ppm): 171.9 (q, C-8/8'), 171.6 (q, C-8/8'), 155.5 (q, C-11), 138.5 (q, C-4), 133.8 (q, C-6), 131.8 (q, C-15), 130.4 (t, C-5), 129.3 (t, C-14), 128.3 (t, C-1/3/13), 128.1 (t, C-2), 127.9 (t, C-1/3/13), 126.4 (q, C-10), 111.3 (t, C-12), 60.8 (s, C-9,9'), 55.6 (p, C-17), 41.5 (s, C-7), 40.5 (s, C-16), 14.2 (p, C-18,18') ppm. **ESI-MS**: ges.  $[\text{M}+\text{H}^+]$  = 357.1702, gef.  $[\text{M}+\text{H}^+]$  = 357.1720.

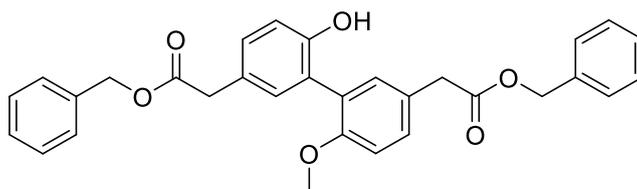
### Dibenzyl-2,2'-(6-methoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (**19**)



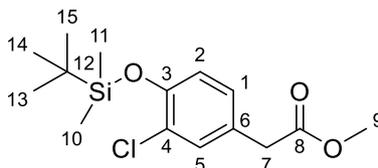
Die Darstellung erfolgte nach der Vorschrift für die Benzylierungsreaktion ausgehend vom Diacetat **18** (30 mg, 0.08 mmol, 1 Äq.). Die säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 7:1 → 2:1) ergab das gewünschte benzylierte Produkt **19** (19.2 mg, 0.04 mmol, 50%) als hellgelbes, viskoses Öl.

$R_f$  = 0.52 (PE:EtOAc = 4:1);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3$  = 7.26 ppm): 7.42-7.40 (2H, m, H-5,17), 7.37-7.29 (11H, m, H-11-15,11'-15',1), 7.27-7.22 (2H, m, H-3,21), 7.21-7.20 (1H, m, H-2), 6.93-9.91 (1H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-20), 5.14 (4H, s, H-9,9'), 3.77 (3H, s, H-23), 3.71 (2H, s, H-7), 3.64 (2H, s, H-22) ppm.  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3$  = 77.0 ppm): 171.6 (q, C-8,8'), 155.5 (t, C-19), 142.5 (q, C-4), 132.8 (q, C-10,10'), 131.8 (q, C-18,6), 129.8 (t, C-11,15,11',15'/14,12,14',12'), 129.6 (t, C-11,15,11',15'/14,12,14',12'), 127.9 (t, C-1), 126.3 (t, C-13,13'), 125.0 (t, C-17,5,21), 123.7 (t, C-3), 116.3 (t, C-2), 111.8 (t, C-20), 66.5 (s, C-9,9'), 54.5 (p, C-23), 41.5 (s, C-7,7') ppm; **ESI-MS**: ges.  $[\text{M}+\text{H}^+]$  = 481.2010, gef.  $[\text{M}+\text{H}^+]$  = 481.2015.

### 3.1.2.4 Dibenzyl-2,2'-(6-hydroxy-6'-methoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (22)



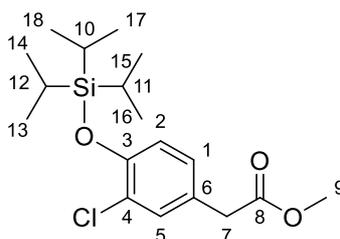
### Methyl-2-(3-chloro-4-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)acetat (20)



Das Hydroxyphenylacetat **14** (500 mg, 2.5 mmol, 1 Äq.), Imidazol (425 mg, 6.25 mmol, 3.3 Äq.) und TBDMSCl (452 mg, 3 mmol, 1.2 Äq.) wurden in trockenem Dimethylformamid (5 mL) gelöst. Die Lösung wurde 24 h bei RT gerührt und mit EtOAc, sowie gesättigter NaCl-Lösung versetzt. Die Phasen wurden getrennt und die organische Phase mit fünf Portionen gesättigter NaCl-Lösung, sowie drei Portionen 1M NaOH-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde dreifach mit EtOAc extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden erneut mit zwei Portionen 1M NaOH-Lösung gewaschen und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt **20** (629 mg, 2.01 mmol, 86%) wurde als farbloses Öl erhalten.

$R_f = 0.67$  (PE:EtOAc = 4:1);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7.26$  ppm): 7.27-7.26 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-5), 7.04-7.01 (1H, dd,  $J = 2.4$  Hz, 8.2 Hz, H-1), 6.83-6.81 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2), 3.70 (3H, s, H-9), 3.53 (2H, s, H-7), 1.02 (9H, s, H-13-15), 0.22 (6H, s, H-10,11) ppm.  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm): 171.8 (q, C-8), 150.7 (q, C-3), 131.0 (q, C-6), 128.3 (t, C-1), 127.6 (t, C-4), 125.5 (t, C-5), 120.6 (t, C-2), 52.1 (p, C-9), 40.0 (s, C-7), 25.6 (p, C-13-15), 18.3 (q, C-12), -4.4 (p, C-10,11) ppm.

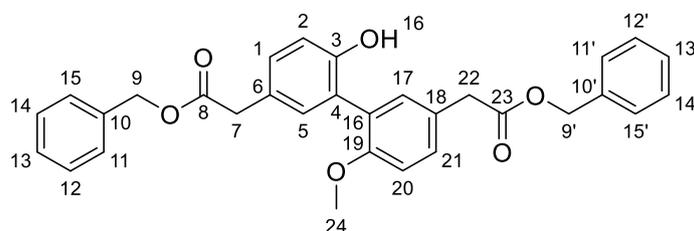
### Methyl-2-(3-chloro-4-((triisopropylsilyl)oxy)phenyl)acetat (21)



Das Hydroxyphenylacetat **14** (200 mg, 1 mmol, 1 Äq.), Imidazol (170 mg, 2.5 mmol, 2.5 Äq.) und TIPSCI (250 mg, 1.3 mmol, 1.3 Äq.) wurden in trockenem Dimethylformamid (2 mL) gelöst. Die Lösung wurde 24 h bei RT gerührt und mit EtOAc und gesättigter NaCl-Lösung versetzt. Die Phasen wurden getrennt und die organische mit fünf Portionen gesättigter NaCl-Lösung, sowie drei Portionen 1M NaOH-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde dreifach mit EtOAc extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden erneut mit zwei Portionen 1M NaOH-Lösung gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt **21** (629 mg, 0.89 mmol, 89%) wurde als farbloses Öl erhalten.

$R_f = 0.57$  (PE:EtOAc = 4:1); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): 7.27-7.26 (1H, d,  $J = 2.2$  Hz, H-5), 7.02-6.99 (1H, dd,  $J = 2.2$  Hz, 8.4 Hz, H-1), 6.85-6.83 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2), 3.69 (3H, s, H-9), 3.52 (2H, s, H-7), 1.36-1.25 (3H, sept,  $J = 7.3$  Hz, H-10,11,12), 1.12-1.11 (18H, d,  $J = 7.4$  Hz, H-13,14,15,16,17,18) ppm. <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm): 171.9 (q, C-8), 151.1 (q, C-3), 131.0 (t, C-5), 128.3 (t, C-1), 127.2 (q, C-6), 125.2 (q, C-4), 119.9 (t, C-2), 52.1 (p, C-9), 40.0 (s, C-7), 17.9 (p, C-13,14,15,16,17,18), 12.9 (t, C-10,11,12) ppm.

### Dibenzyl-2,2'-(6-hydroxy-6'-methoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (**22**)

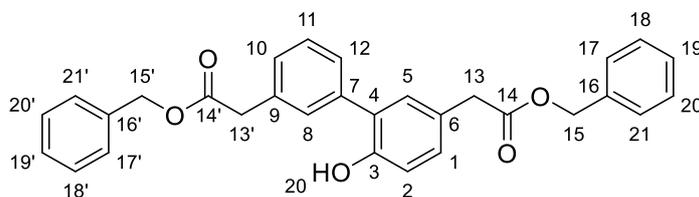


Die Darstellung erfolgte nach der Vorschrift für die *one-pot* SUZUKI-MIYAUURA-Kupplung unter Variation der eingesetzten Edukte. Die Umsetzung des Rohproduktes zum Dibenzylester erfolgte nach der Benzilylierungsvorschrift. Die Eduktvariation wird in der Reihenfolge des Einsatzes in der Reaktion angegeben: **A**) Methoxyphenylacetat **11** (50 mg, 0.19 mmol, 1 Äq.) und Phenylacetat **21** (67.7 mg, 0.19 mmol, 1 Äq.); **B**) Methoxyphenylacetat **11** (50 mg, 0.19 mmol, 1 Äq.) und Phenylacetat **20** (59.7 mg, 0.19 mmol, 1 Äq.). Die säulenchromatographische Reinigung (REVELERIS-PREP; Kartusche: Reveleris<sup>®</sup> HP Si 12 g; Flussrate: 20 mL/min; PE:EtOAc; Gradient: 0-5 min 0% EtOAc, 5-7 min 0-5% EtOAc, 7-12 min 5% EtOAc, 12-20 min 5-25% EtOAc, 20-30 min 25% EtOAc, 30-33 min 25-45% EtOAc, 33-40 min

50% EtOAc) ergab das Produkt **22** (**A**: kein Produkt; **B**: 14.9 mg, 0.03 mmol, 16% über 4 Stufen) als hellgelbes, viskoses Öl.

$R_f = 0.45$  (PE:EtOAc = 4:1);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7.26$  ppm): 7.37-7.28 (11H, m, H-11-15,11'-15',1), 7.23-7.21 (2H, m, H-5,17), 7.14-7.14 (1H, m, H-21), 7.01-6.97 (2H, m, H-2,20), 6.20 (1H, brs, H-16), 5.14 (2H, s, H-9/9'), 5.14 (2H, s, H-9/9'), 3.89 (3H, s, H-24), 3.66 (2H, s, H-7/7'), 3.63 (2H, s, H-7/7') ppm.  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm): 171.7 (q, C-8/23), 171.4 (q, C-8/23), 154.6 (q, C-19), 152.9 (q, C-3), 135.9 (q, C-10/10'), 135.8 (q, C-10/10'), 133.4 (t, C-1), 132.1 (t, C-21), 130.2 (t, C-5/17), 130.2 (t, C-5/17), 128.6 (t, C-11,15/12,14/11',15'/12',14'), 128.5 (t, C-11,15/C-12,14/C-11',15'/C-12',14'), 128.3 (t, C-13/13'), 128.2 (t, C-11,15/C-12,14/C-11',15'/C-12',14'), 128.2 (t, C-13/13'), 128.1 (t, C-11,15/C-12,14/C-11',15'/C-12',14'), 127.6 (q, C-4/16), 126.9 (q, C-4/16), 126.3 (q, C-6/18), 126.0 (q, C-6/18), 117.7 (t, C-2), 111.8 (t, C-20), 66.7 (s, C-9/9'), 66.6 (s, C-9/9'), 56.4 (p, C-24), 40.5 (s, C-7/22), 40.4 (s, C-7/22) ppm. **ESI-MS**: ges.  $[\text{M}+\text{H}^+] = 497.1959$ , gef.  $[\text{M}+\text{H}^+] = 497.0164$ .

### 3.1.2.5 Dibenzyl-2,2'-(6-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (**23**)



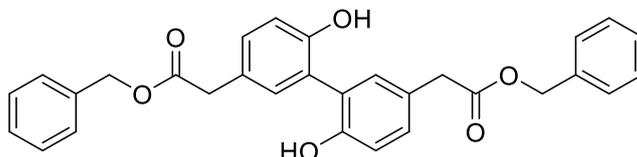
**Variante I:** Das Diacetat **19** (50 mg, 0.10 mmol, 1 Äq.) wurde in Essigsäure (10 mL) gelöst. Essigsäureanhydrid (43.2 mg, 0.42 mmol, 4.2 Äq.) sowie HBr-Lösung (44% in  $\text{Et}_2\text{O}$ , 226  $\mu\text{L}$ , 2 mmol, 20 Äq.) wurden zur Lösung hinzugefügt. Die Lösung wurde 6 h bei 120 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe vom kalten Wasser beendet. Die Lösung wurde mit EtOAc versetzt und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde dreifach mit EtOAc extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde nicht erhalten (das Edukt wurde zu 95% isoliert).

**Variante II:** Die Darstellung erfolgte nach der Vorschrift für die *one-pot* SUZUKI-MIYAUURA-Kupplung unter Variation der eingesetzten Edukte. Das Rohprodukt wurde nach der Benzylierungsvorschrift zum Dibenzylester umgesetzt. Die Eduktvariation wird in der Reihenfolge des Einsatzes in der Reaktion angegeben: **A**) Hydroxyphenylacetat **14** (50 mg, 0.25 mmol, 1 Äq.) und Bromphenylacetat **1** (56.9 mg, 0.25 mmol, 1 Äq.); **B**) Hydroxyphenylacetat **14** (50 mg, 0.25 mmol, 1 Äq.) und Chlo-

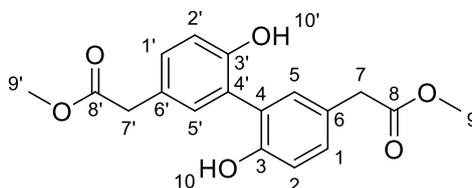
rophenylacetat **3** (46.1 mg, 0.25 mmol, 1 Äq.); **C**) Bromophenylacetat **1** (150 mg, 0.66 mmol, 1 Äq.) und Phenylacetat **20** (207 mg, 0.66 mmol, 1 Äq.). Die säulenchromatographische Reinigung (REVELERISPREP; Kartusche: Reveleris® HP Si 12 g; Flussrate: 20 mL/min; PE:EtOAc; Gradient: 0-5 min 2% EtOAc, 5-7 min 2-10% EtOAc, 7-20 min 10% EtOAc, 20-25 min 10-25% EtOAc, 25-35 min 25% EtOAc, 35-37 min 25-45% EtOAc, 37-45 min 50% EtOAc) ergab das Produkt **23** (**A**: kein Produkt; **B**: kein Produkt; **C**: 60.6 mg, 0.13 mmol, 19% über 4 Stufen) als hellgelbes, viskoses Öl.

$R_f = 0.37$  (PE:EtOAc = 4:1);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7.26$  ppm): 7.49-7.44 (4H, m, H-10,11,12,1), 7.41-7.36 (2H, m, H-5,8), 7.35-7.30 (10H, m, H-17-21,17'-21'), 7.29-7.26 (1H, m, H-2), 5.15 (4H, s, H-15,15'), 3.73 (4H, s, H-7,7') ppm.  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm): 171.3 (q, C-14,14'), 155.6 (t, C-3), 142.9 (q, C-7), 132.8 (q, C-16,16'), 131.9 (q, C-6,9), 129.7 (t, C-17,21,17',21'/18,20,18',20'), 129.3 (t, C-17,21,17',21'/18,20,18',20'), 127.9 (t, C-10), 126.7 (t, C-19,19'), 125.0 (t, C-5,8,1), 124.1 (t, C-12), 116.1 (t, C-11), 111.3 (t, C-2), 66.7 (s, C-15,15'), 41.4 (s, C-13,13') ppm. **ESI-MS**: ges.  $[\text{M}+\text{H}^+] = 467.1853$ , gef.  $[\text{M}+\text{H}^+] = 467.1855$ .

### 3.1.2.6 Dibenzyl-2,2'-(6,6'-dihydroxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (**26**)



### Dimethyl-2,2'-(6,6'-dihydroxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (**24**)



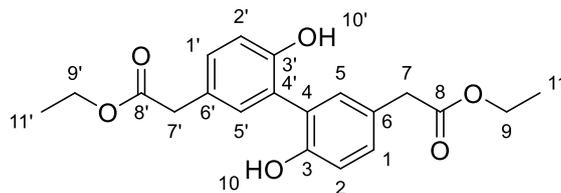
**Variante I:** Die Synthese erfolgte nach der Vorschrift für die  $\text{FeCl}_3$ -vermittelte oxidative Kupplung. Das Hydroxyphenylacetat **9** (80 mg, 0.48 mmol, 1 Äq.) wurde als Edukt eingesetzt. **Variante II:** Das Hydroxyphenylacetat **9** (300 mg, 1.8 mmol, 1 Äq.) und  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (3.4 g, 12.6 mmol, 7 Äq.) wurden im Mikrowellengefäß vorgelegt, in trockenem Methylenchlorid (3 mL) suspendiert und in Mikrowellenapparatur 1 h bei 120 °C und 13 bar Überdruck gerührt. Die Lösung wurde mit Wasser und EtOAc versetzt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige dreifach mit EtOAc extrahiert.

Die vereinten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 4:1 → 2:1) ergab das Produkt **24** (**I**:13.2 mg, 0.04 mmol, 8%; **II**: 118 mg, 0.36 mmol, 20%) als hellgelbes, viskoses Öl.

Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur beschriebenen überein<sup>75</sup>.

**R<sub>f</sub>**=0.34 (PE:EtOAc = 4:1); **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): 7.26-7.25 (2H, d, *J* = 2.1 Hz, H-5,5'), 7.10-7.07 (2H, dd, *J* = 8.4 Hz, 2.1 Hz, H-1,1'), 6.98-6.95 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-2,2'), 5.51 (2H, brs, H-10,10'), 3.70 (6H, s, H-9,9'), 3.54 (4H, s, H-7,7') ppm. **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm): 171.8 (q, C-8,8'), 150.5 (q, C-3,3'), 129.7 (t, C-5,5'), 129.4 (t, C-1,1'), 127.1 (q, C-6,6'), 119.8 (q, C-4,4'), 116.3 (t, C-2,2'), 52.2 (p, C-9,9'), 40.0 (s, C-7,7') ppm. **ESI-MS**: ges. [M+Na<sup>+</sup>] = 353.0996, gef. [M+Na<sup>+</sup>] = 352.9972.

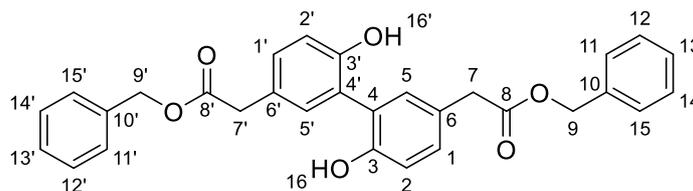
#### Diethyl-2,2'-(6,6'-dihydroxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (**25**)



Die Darstellung erfolgte nach der Vorschrift für die *one-pot* SUZUKI-MIYAURA-Kupplung. Das Phenylacetat **20** (100 mg, 0.28 mmol, 1 Äq.) und das Hydroxyphe-nylacetat **10** (64 mg, 0.28 mmol, 1 Äq.) wurden jeweils als Substrat I und II verwendet. Um die Umesterungsreaktion herbeizuführen, wurde die Menge von der stärkeren Base K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> im zweiten Schritt der SUZUKI-MIYAURA-Kupplung von 3 Äq. auf 5 Äq. erhöht. Die säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 9:1 → 4:1) ergab den Diethylester **25** (26.1 mg, 0.07 mmol, 26%) als hellgelbes, viskoses Öl.

**R<sub>f</sub>**=0.38 (PE:EtOAc = 4:1); **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): 7.26-7.25 (2H, d, *J* = 2.1 Hz, H-5,5'), 7.10-7.08 (2H, dd, *J* = 8.4 Hz, 2.1 Hz, H-1,1'), 6.97-6.95 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-2,2'), 5.51 (2H, brs, H-10,10') 4.18-4.13 (4H, q, *J* = 7.1 Hz, H-9,9'), 3.52 (4H, s, H-7,7'), 1.27-1.24 (6H, t, *J* = 7.1 Hz, H-11,11') ppm. **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm): 171.4 (q, C-8,8'), 150.4 (q, C-3,3'), 129.6 (t, C-5,5'), 129.3 (t, C-1,1'), 127.3 (q, C-6,6'), 119.8 (q, C-4,4'), 116.2 (t, C-2,2'), 61.0 (s, C-9,9'), 40.2 (s, C-7,7'), 14.1 (p, C-11,11') ppm. **ESI-MS**: ges. [M+H<sup>+</sup>] = 359.1495, gef. [M+H<sup>+</sup>] = 359.1501.

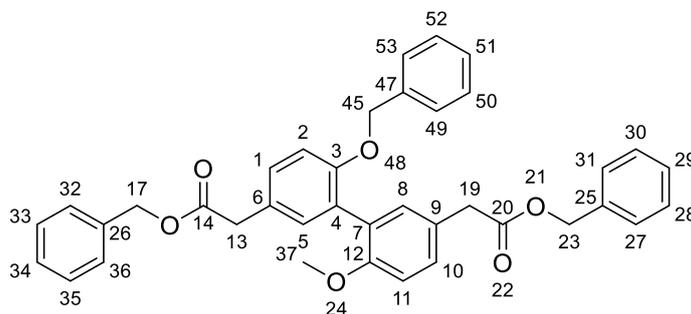
### Dibenzyl-2,2'-(6,6'-dihydroxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (**26**)



**Variante I:** Die Darstellung erfolgte nach der Vorschrift für die Benzylierungsreaktion ausgehend vom Diacetat **25** (100 mg, 0.30 mmol, 1 Äq.). **Variante II:** Die Darstellung erfolgte nach der Vorschrift für die *one-pot* SUZUKI-MIYAUURA-Kupplung mit der direkten Umesterung zum Dibenzylester. Das Phenylacetat **20** (100 mg, 0.28 mmol, 1 Äq.) wurde jeweils als Substrat I und II verwendet. Die säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 4:1 → 2:1) ergab das benzylierte Produkt **26** (**I**: 120 mg, 0.25 mmol, 83%; **II**: 16.4 mg, 0.034 mmol, 12%) als hellgelbes, viskoses Öl.

$R_f = 0.37$  (PE:EtOAc = 4:1);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7.26$  ppm): 7.39-7.30 (10H, m, H-11-15, 11'-15'), 7.26-7.25 (2H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-5,5'), 7.10-7.08 (2H, dd,  $J = 2$  Hz, 8.0 Hz, H-1,1'), 6.97-6.95 (2H, d,  $J = 2$  Hz, 8.1 Hz, H-2), 5.51 (2H, brs, H-16,16'), 5.14 (4H, s, H-9,9'), 3.58 (4H, s, H-7,7') ppm.  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm): 171.2 (q, C-8,8'), 150.5 (q, C-3,3'), 135.6 (q, C-10,10'), 129.7 (q, C-4,4'), 129.4 (q, C-6,6'), 128.6 (t, C-11,15,11'-15'/12,14,12',14'), 128.3 (t, C-13,13'), 128.2 (t, C-11,15,11'-15'/12,14,12',14'), 127.0 (t, C-5), 126.9 (t, C-5'), 119.8 (t, C-1,1'), 116.2 (t, C-2,2'), 66.8 (s, C-9,9'), 40.1 (s, C-7,7') ppm. **ESI-MS:** ges.  $[\text{M}+\text{Na}^+] = 505.1622$ , gef.  $[\text{M}+\text{Na}^+] = 505.1701$ .

### 3.1.2.7 Dibenzyl-2,2'-(6-(benzyloxy)-6'-methoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (**27**)

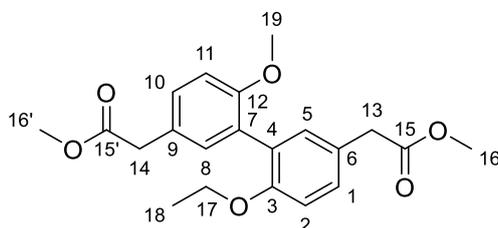


Das Diacetat **22** (50 mg, 0.1 mmol, 1 Äq.) wurde in Acetonitril (8 mL) gelöst. Die Lösung wurde mit 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (30.4 mg, 0.2 mmol, 2 Äq.) und Benzylbromid (51.3 mg, 0.3 mmol, 3 Äq.) versetzt und 20 h bei 85 °C gerührt. Die Lösung wurde mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung neutralisiert und mit EtOAc dreifach extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung und über

MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und die säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 4:1) ergab das Produkt **27** (41 mg, 0.07 mmol, 74%) als hellgelbes Öl.

$R_f$  = 0.68 (PE:EtOAc = 4:1); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): 7.32-7.19 (17H, m, H-27-31,32-36,10,1), 7.18-7.17 (2H, m, H-8,5), 6.94-6.92 (1H, m, H-1), 6.91-6.88 (1H, m, H-11), 5.13 (2H, s, H-17/23), 5.12 (2H, s, H-17/23), 5.04 (2H, s, H-45), 3.70 (3H, s, H-37), 3.63 (4H, s, H-19,13) ppm. <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm): 171.7 (q, C-14,20), 156.2 (q, C-12), 155.4 (q, C-3), 137.6 (q, C-47), 135.9 (q, C-25/26), 135.9 (q, C-25/26), 132.5 (t, C-5/8), 129.4 (t, C-10), 128.5 (t, C-31,27,32,36/33,35,30,28), 128.5 (t, C-31,27,32,36/33,35,30,28), 128.4 (t, C-5/8), 128.3 (t, C-51), 128.2 (t, C-50,52/49,53), 128.2 (t, C-50,52/49,53), 128.1 (t, C-34/29), 128.1 (t, C-34/29), 127.6 (q, C-9/6), 127.4 (q, C-9/6), 126.6 (q, C-4), 126.1 (q, C-7), 125.5 (t, C-5), 113.1 (t, C-4), 110.8 (t, C-11), 70.3 (s, C-45), 66.5 (s, C-17,/23), 66.5 (s, C-17,/23), 55.6 (p, C-37), 40.5 (s, C-13/23), 40.5 (s, C-13/23) ppm. **ESI-MS**: ges. [M+Na<sup>+</sup>] = 609.2248, gef. [M+Na<sup>+</sup>] = 609.2352.

### 3.1.2.8 Dimethyl-2,2'-(6-ethoxy-6'-methoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat(28)

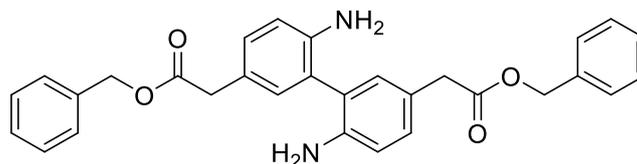


Die Darstellung erfolgte nach der Vorschrift für die *one-pot* SUZUKI-MIYAUURA-Kupplung. Das Methoxyphenylacetat **11** (50 mg, 0.2 mmol, 1 Äq) und das Hydroxyphenylacetat **14** (39.1 mg, 0.2 mmol, 1 Äq) wurden jeweils als Substrat I und II verwendet. Die Ethylierung wurde durch Erhöhung der Reaktionszeit von 12 h auf 22 h herbeigeführt. Die säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 4:1) ergab das gewünschte Produkt **28** (11.2 mg, 0.03 mmol, 15%) als hellgelbes, viskoses Öl.

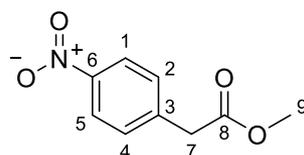
$R_f$  = 0.63 (PE:EtOAc = 4:1); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): 7.28-7.25 (2H, m, H-5,8), 7.18-7.17 (2H, m, H-1,10), 6.95-6.93 (2H, d,  $J$  = 8.5 Hz, H-2,11), 4.20-4.15 (2H, q,  $J$  = 7.2 Hz, H-17), 3.78 (6H, s, H-16,16'), 3.71 (3H, s, H-19), 3.61 (2H, s, H-13/14), 3.60 (2H, s, H-13/14), 1.30-1.27 (3H, t,  $J$  = 7.2 Hz, H-18) ppm. <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm): 172.3 (q, C-15/15'), 171.9 (q, C-15/15'), 156.2 (q, C-3), 156.1 (q, C-12), 132.3 (t, C-8), 132.2 (t, C-5), 129.4 (q, C-

9/6), 127.6 (t, C-10), 127.5 (t, C-1), 125.8 (q, C-4), 125.6 (q, C-7), 111.2 (t, C-11), 111.1 (t, C-2), 60.7 (s, C-17), 55.8 (p, C-19), 52.0 (p, C-16,16'), 40.5 (s, C-13/14), 40.3 (s, C-13/14), 14.2 (p, C-18) ppm. **ESI-MS:** ges.  $[M+Na^+] = 395.1465$ , gef.  $[M+Na^+] = 395.1471$ .

### 3.1.2.9 Dibenzyl-2,2'-(6,6'-diamino-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (**34**)



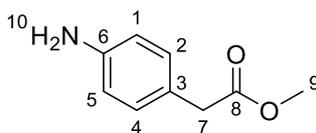
### Methyl-2-(4-nitrophenyl)acetat (**29**)



2-(4-Nitrophenyl)essigsäure (**30**, 5.0 g, 27.6 mmol, 1 Äq.) wurde in Methanol gelöst. Die Lösung wurde mit konzentrierter Salzsäure (37%, MeOH:HCl = 7:1) versetzt und 48 h bei 80 °C gerührt. Das Volumen der Lösung wurde reduziert und der pH-Wert wurde und mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und 2 M NaOH-Lösung auf 10 eingestellt. Phasen wurden getrennt und die organische Phase erneut mit 1 M NaOH-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde dreifach mit EtOAc extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit 1 M NaOH-Lösung zweifach gewaschen. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Methylacetat **29** (4.3 g, 22.0 mmol, 80%) wurde als gelber, kristalliner Feststoff erhalten.

$R_f = 0.47$  (PE:EtOAc = 3:1); **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): 8.21-8.19 (2H, d,  $J = 8.9$  Hz, H-1,5), 7.47-7.45 (2H, d,  $J = 8.9$  Hz, H-2,4), 3.74 (2H, s, H-7), 3.73 (3H, s, H-9) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm): 170.6 (q, C-8), 147.2 (q, C-3), 141.2 (q, C-6), 130.3 (t, C-2,4), 123.8 (t, C-1,5), 52.4 (p, C-9), 40.8 (s, C-7) ppm.

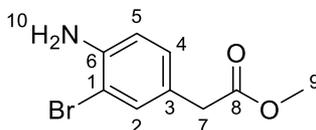
### Methyl-2-(4-aminophenyl)acetat (**31**)



**Variante I:** Das Nitrophenylacetat **29** (100 mg, 0.51 mmol, 1 Äq.) wurde in Methanol (5 mL) und mit Pd/C (20 mg, 0.19 mmol, 0.37 Äq.) versetzt. Die entstandene Suspension wurde an der Hydrierungsanlage 4 h mit Wasserstoff begast. Die Suspension wurde durch Celite® filtriert und mit EtOAc gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. **Variante II:** Das Nitrophenylacetat **29** (4.3 g, 22.0 mmol, 1 Äq.) wurde in EtOAc gelöst. SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (24.8 g, 110 mmol, 5 Äq.) und katalytische Menge Essigsäure wurden der Lösung hinzugefügt. Die Lösung wurde 20 h bei 95 °C gerührt. Die Lösung wurde abgekühlt, mit Eis hydrolysiert und mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung neutralisiert. Phasen wurden getrennt und die wässrige fünffach mit EtOAc extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc + 1% Et<sub>3</sub>N = 3:1) ergab das Produkt **31** (**I**: 29.7 mg, 0.18 mmol, 36%; **II**: 3.1 g, 18.4 mmol, 84%) als hellbraunes Öl.

**R<sub>f</sub>** = 0.63 (PE:EtOAc = 3:1); **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): 7.08-7.06 (2H, m, H-2,4), 6.68-6.66 (2H, m, H-1,5), 3.67 (3H, s, H-9), 3.52 (2H, s, H-7) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm): 172.6 (q, C-8), 144.9 (q, C-3), 130.1 (t, C-2,4), 124.2 (q, C-6), 115.5 (t, C-1,5), 51.9 (p, C-9), 40.3 (s, C-7) ppm. **ESI-MS:** ges. [M+H<sup>+</sup>] = 166.0863, gef. [M+H<sup>+</sup>] = 166.1453.

### Methyl-2-(4-amino-3-bromophenyl)acetat (**32**)



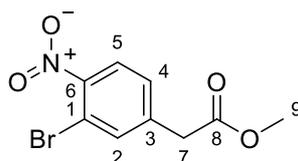
Das Aminophenylacetat **31** (3.7 g, 21.9 mmol, 1 Äq) wurde im Acetonitril-Essigsäure-Gemisch (2:1) gelöst. Das *N*-Bromosuccinimid (5.06 g, 28.4 mmol, 1.3 Äq) wurde in Acetonitril gelöst und der Eduktlösung über 1 h bei 0 °C zugetropft. Die Lösung wurde weitere 2 h bei 0 °C gerührt und langsam auf RT gebracht. Nach Zugabe von Wasser wurde mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung neutralisiert. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige dreifach mit EtOAc extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrock-

net. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc + 1% Et<sub>3</sub>N = 10:1 → 2:1) ergab das Produkt **32** (4.08 g, 16.8 mmol, 77%) als dunkelbraunes, viskoses Öl.

Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur beschriebenen überein<sup>77</sup>.

**R<sub>f</sub>**(PE:EtOAc = 4:1) = 0.54; **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): 7.36-7.35 (1H, d, *J* = 1.84 Hz, H-2), 7.06-7.03 (1H, dd, *J* = 1.9 Hz, 8.1 Hz, H-4), 6.83-6.81 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-5), 4.85 (2H, brs, H-10), 3.69 (3H, s, H-9), 3.50 (2H, s, H-7) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm): 172.1 (q, C-8), 143.1 (q, C-6), 133.1 (t, C-2), 129.2 (t, C-4), 124.9 (q, C-3), 115.7 (t, C-5), 109.1 (q, C-1), 56.0 (p, C-9), 39.8 (s, C-7) ppm.

### Methyl-2-(3-bromo-4-nitrophenyl)acetat (**33**)



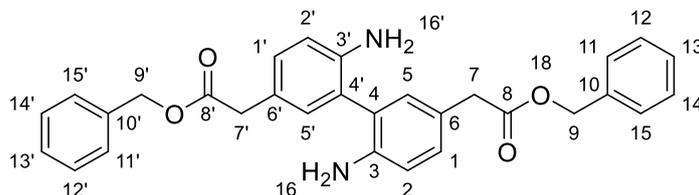
*Meta*-Chlorophenylbenzoesäure (568 mg, 3.28 mmol, 4 Äq.) wurde im Kolben vorgelegt und in 1,2-Dichloroethan (65 mL) gelöst (Lösung I). Methyl-2-(4-amino-3-bromophenyl)acetat (**32**, 200 mg, 0.82 mmol, 1 Äq.) wurde ebenfalls in 1,2-Dichloroethan (20 mL) gelöst und in den Tropftrichter überführt (Lösung II). Lösung I wurde zum Sieden gebracht und Lösung II wurde über 1 h hinzuge tropft. Die entstandene hellgrüne Lösung wurde 10 h bei 85 °C gerührt. Nach dem Abkühlen der hellbraunen Lösung auf RT wurde ein farbloser Feststoff als Bodensatz erhalten. Die Suspension wurde mit wässriger Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Lösung versetzt und mit 2 M NaOH-Lösung auf pH=12 eingestellt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde zehnfach mit EtOAc extrahiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt **33** (188 mg, 0.69 mmol, 85%) wurde als hellgelbes, viskoses Öl erhalten.

Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur beschriebenen überein<sup>77</sup>.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): 7.85-7.83 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-5), 7.68-7.67 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-2), 7.39-7.36 (1H, dd, *J* = 8.3 Hz, 1.9 Hz, H-4), 3.73

(3H, s, H-9), 3.68 (2H, s, H-7) ppm.  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm): 172.0 (q, C-8), 154.8 (q, C-6), 134.1 (t, C-5), 129.2 (t, C-1), 127.8 (t, C-4), 111.9 (q, C-3), 111.2 (t, C-2), 56.2 (p, C-9), 39.7 (s, C-7) ppm.

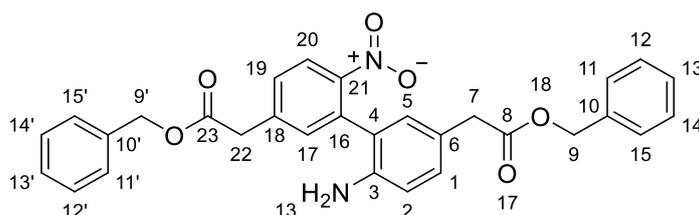
### Dibenzyl-2,2'-(6,6'-diamino-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (34)



Die Darstellung erfolgte nach der Vorschrift für die *one-pot* SUZUKI-MIYAUURA-Kupplung mit der direkten Umesterung zum Dibenzylester. Das Bromophenylacetat **32** (100 mg, 0.4 mmol, 1 Äq.) wurde als Substrat I und II verwendet. Die säulenchromatographische Reinigung (REVELERISPREP; Kartusche: Reveleris<sup>®</sup> HP Si 12 g; Flussrate: 20 mL/min; PE:EtOAc + 0.5%  $\text{Et}_3\text{N}$ ; Gradient: 0-5 min 2% EtOAc, 5-7 min 2-10% EtOAc, 7-20 min 10% EtOAc, 20-25 min 10-25% EtOAc, 25-35 min 25% EtOAc, 35-37 min 25-45% EtOAc, 37-45 min 50% EtOAc) ergab das Produkt **34** (27.4 mg, 0.057 mmol, 14% über vier Stufen) als hellbraunes Öl.

$R_f = 0.56$  (PE:EtOAc = 3:1);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7.26$  ppm): 7.38-7.30 (10H, m, H-11-15, 11'-15'), 7.20-7.17 (2H, t,  $J = 7.9$  Hz, H-1, 1'), 6.86-6.83 (2H, m, H-5, 5'), 6.77-6.75 (2H, m, H-2, 2'), 6.74-6.73 (4H, m, H-16, 16'), 5.14 (4H, s, H-9, 9'), 3.62 (4H, s, H-7, 7') ppm.  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm): 171.2 (q, C-8, 8'), 155.7 (q, C-3, 3'), 135.8 (q, C-10, 10'), 135.5 (q, C-6, 6'), 129.8 (t, C-1, 1'), 128.6 (t, C-11, 11', 15, 15'/12, 12, 12', 14'), 128.3 (t, C-13, 13'), 128.2 (t, C-11, 11', 15, 15'/12, 12, 12', 14'), 121.8 (t, C-5, 5'), 116.2 (q, 4, 4'), 114.2 (t, C-2), 66.7 (s, C-9, 9'), 41.2 (s, C-7, 7') ppm. **ESI-MS**: ges.  $[\text{M}+\text{Na}^+] = 503.1941$ , gef.  $[\text{M}+\text{Na}^+] = 503.1957$ .

### 3.1.2.10 Dibenzyl-2,2'-(6-amino-6'-nitro-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (35)

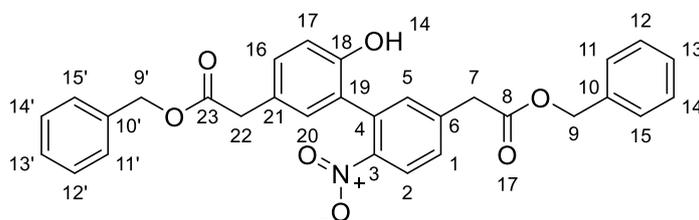


Die Darstellung erfolgte nach der Vorschrift für die *one-pot* SUZUKI-MIYAUURA-Kupplung mit der direkten Umesterung zum Dibenzylester. Das Bromophenylacetat

**32** (100 mg, 0.4 mmol, 1 Äq.) und das Nitrophenylacetat **33** (111 mg, 0.41 mmol, 1 Äq.) wurden jeweils als Substrat I und II verwendet. Die säulenchromatographische Reinigung (REVELERISPREP; Kartusche: Reveleris<sup>®</sup> HP Si 12 g; Flussrate: 20 mL/min; PE:EtOAc + 0.5% Et<sub>3</sub>N; Gradient: 0-5 min 0% EtOAc, 5-7 min 0-15% EtOAc, 7-20 min 15% EtOAc, 20-25 min 15-25% EtOAc, 25-35 min 25% EtOAc, 35-37 min 25-45% EtOAc, 37-45 min 50% EtOAc) ergab das Produkt **35** (37.8 mg, 0.074 mmol, 20% über vier Stufen) als hellbraunes Öl.

$R_f = 0.43$  (PE:EtOAc = 3:1); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): 7.40-7.39 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-17), 7.38-7.27 (13H, m, H-11-15,11'-15',1,2,5), 7.06-7.03 (1H, dd,  $J = 2.0$  Hz, 8.3 Hz, H-19), 6.59-6.57 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz, H-20), 5.12 (4H, s, H-9,9'), 3.81 (2H, s, H-22), 3.52 (2H, s, H-7) ppm. <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm): 171.6 (q, C-8,23), 143.7 (q, C-21), 138.5 (q, C-3), 135.8 (q, C-10,10'), 133.1 (t, C-17), 129.4 (t, C-19), 128.7 (t, C-11,15,11',15'/12,14,12',14'), 128.6 (t, C-11,15,11',15'/12,14,12',14'), 128.2 (t, C-13,13'), 128.1 (q, C-10,10'), 128.1 (t, C-1/5), 127.4 (t, C-1/5), 127.3 (q, C-18), 123.6 (t, C-20), 111.8 (t, C-2), 109.7 (q, C-6), 66.7 (s, C-9,9'), 48.2 (s, C-22), 40.0 (s, C-7) ppm. **ESI-MS**: ges. [M+H<sup>+</sup>] = 511.1864, gef. [M+H<sup>+</sup>] = 511.1772.

### 3.1.2.11 Dibenzyl-2,2'-(6-hydroxy-6'-nitro-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (**36**)



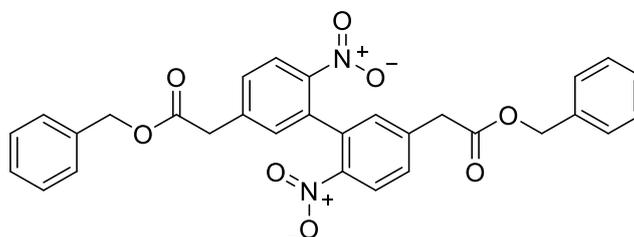
**Variante I:** Die Darstellung erfolgte nach der Vorschrift für die *one-pot* SUZUKI-MIYAUURA-Kupplung mit der direkten Umesterung zum Dibenzylester. Das Nitrophenylacetat (**33**, 100 mg, 0.37 mmol, 1 Äq.) und das Hydroxyphenylacetat (**14**, 90.3 mg, 0.37 mmol, 1 Äq.) wurden jeweils als Substrat I und II verwendet. Das Produkt wurde nicht erhalten.

**Variante II:** Das Nitrophenylacetat **33** (50 mg, 0.18 mmol, 1 Äq.), das Methyl-2-(4-hydroxyphenyl)acetat (**9**, 36.5 mg, 0.22 mmol, 1.2 Äq.) und KO<sup>t</sup>Bu (51.6 mg, 0.46 mmol, 2.5 Äq.) wurden in trockenem DMSO (6 mL) gelöst. Die Lösung wurde 8 h bei RT gerührt und mit 2 M HCl-Lösung und EtOAc versetzt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde mit EtOAc vierfach extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter

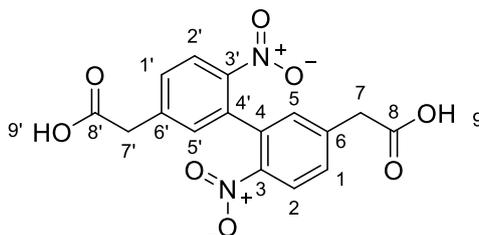
vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde benzyliert. Die säulenchromatographische Reinigung (REVELERISPREP; Kartusche: Reveleris<sup>®</sup> HP Si 12 g; Flussrate: 20 mL/min; PE:EtOAc; Gradient: 0-3 min 3% EtOAc, 3-7 min 3-15% EtOAc, 7-20 min 15% EtOAc, 20-25 min 15-25% EtOAc, 25-35 min 25% EtOAc, 35-37 min 25-45% EtOAc, 37-45 min 50% EtOAc) ergab das Produkt **36** (18.7 mg, 0.036 mmol, 20% über drei Stufen) als hellgelbes Öl.

$R_f = 0.31$  (PE:EtOAc = 4:1); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): 7.47-7.44 (3H, m, H-5,20,1), 7.42-7.40 (2H, m, H-16,2), 7.39-7.30 (10H, m, H-11-15,11'-15'), 7.00-6.97 (1H, m, H-17), 5.15 (4H, s, H-9,9'), 5.10 (1H, brs, H-14), 3.78 (4H, s, H-7,7') ppm. <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm): 170.0 (q, C-8,23), 141.1 (q, C-6,21), 135.3 (q, C-10,10'), 131.5 (q, C-3), 130.3 (q, C-4), 129.1 (q, C-19), 128.7 (t, C-2), 128.7 (t, C-11,15,11',15'/12,14,12',14'), 128.5 (t, C-13,13'), 128.3 (t, C-11,15,11',15'/12,14,12',14'), 128.1 (t, C-16), 127.5 (q, C-18), 123.8 (q, C-20,5), 115.3 (t, C-17), 115.2 (t, C-1), 67.2 (s, C-9,9'), 41.0 (s, C-7,7') ppm. **ESI-MS**: ges. [M+H<sup>+</sup>] = 512.1704, gef. [M+H<sup>+</sup>] = 512.1471.

### 3.1.2.12 Dibenzyl-2,2'-(6,6'-dinitro-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (**38**)



### 2,2'-(6,6'-Dinitro-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diessigsäure (**37**)

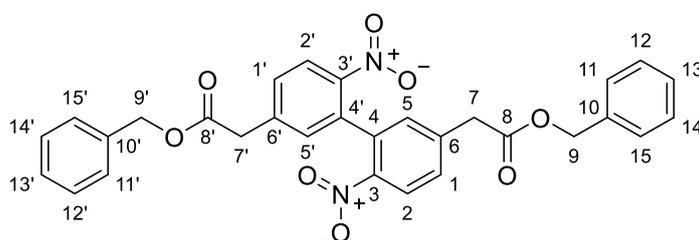


Das Nitrophenylacetat **33** (50 mg, 0.18 mmol, 1 Äq.), das Nitrophenylacetat **29** (42.9 mg, 0.22 mmol, 1.2 Äq.) und KO<sup>t</sup>Bu (51.6 mg, 0.46 mmol, 2.5 Äq.) wurden in trockenem DMSO (6 mL) gelöst. Die Lösung wurde 8 h bei RT gerührt und mit 2 M HCl-Lösung und EtOAc versetzt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde mit EtOAc vierfach extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Die säulenchromatographische Reinigung (REVELERISPREP; Kartusche: Reveleris<sup>®</sup> HP Si 12 g; Flussrate: 20 mL/min; PE:EtOAc; Gradi-

ent: 0-3 min 5% EtOAc, 3-7 min 5-20% EtOAc, 7-20 min 20% EtOAc, 20-25 min 20-25% EtOAc, 25-35 min 25% EtOAc, 35-37 min 25-45% EtOAc, 37-45 min 50% EtOAc) ergab das Produkt **37** (21.6 mg, 0.06 mmol, 32%) als hellbraunes Öl.

$R_f = 0.24$  (PE:EtOAc = 1:4);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{SO} = 3.50$  ppm): 10.93 (2H, s, H-9,9'), 7.85-7.81 (3H, m, H-1,1',5), 6.96-6.92 (3H, m, H-2,2',5'), 3.92 (4H, s, H-7,7') ppm.  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{SO} = 40.0$  ppm): 185.4 (q, C-8,8'), 165.5 (q, C-3,3'), 164.8 (q, C-6,6'), 133.1 (t, C-1,1'5), 123.6 (t, C-4,4'), 116.6 (q, C-2,2',5'), 53.2 (s, C-7,7') ppm. **ESI-MS**: ges.  $[\text{M}]^- = 358.0448$ , gef.  $[\text{M}]^- = 358.0479$ .

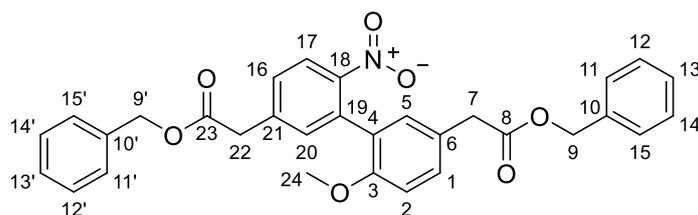
### 3.1.2.13 Dibenzyl-2,2'-(6,6'-dinitro-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (**38**)



Das Nitrophenylacetat **33** (50 mg, 0.18 mmol, 1 Äq.), das Nitrophenylacetat **29** (42.9 mg, 0.22 mmol, 1.2 Äq.) und  $\text{KO}t\text{Bu}$  (51.6 mg, 0.46 mmol, 2.5 Äq.) wurden in trockenem DMSO (6 mL) gelöst. Die Lösung wurde 8 h bei RT gerührt und mit 2 M HCl-Lösung und EtOAc versetzt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde mit EtOAc vierfach extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde verseift und benzyliert. Die säulenchromatographische Reinigung (REVELERIS PREP; Kartusche: Reveleris<sup>®</sup> HP Si 12 g; Flussrate: 20 mL/min; PE:EtOAc; Gradient: 0-3 min 5% EtOAc, 3-7 min 5-20% EtOAc, 7-20 min 20% EtOAc, 20-25 min 20-25% EtOAc, 25-35 min 25% EtOAc, 35-37 min 25-45% EtOAc, 37-45 min 50% EtOAc) ergab das Produkt **38** (7.56 mg, 0.014 mmol, 8% über drei Stufen) als hellgelbes Öl.

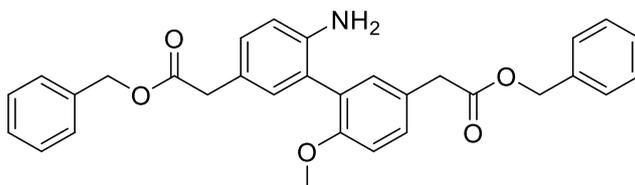
$R_f = 0.64$  (PE:EtOAc = 2:1);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7.26$  ppm): 8.03-7.99 (3H, m, H-1,1',5), 7.45-7.33 (10H, m, H-11-15,11'-15'), 7.07-7.03 (3H, m, H-2,2',5'), 5.16 (4H, s, H-9,9'), 3.96 (4H, s, H-7,7') ppm.  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm): 184.4 (q, C-8,8'), 164.3 (q, C-3,3'), 164.2 (q, C-6,6'), 135.8 (q, C-10,10'), 132.7 (t, C-1,1',5), 128.8 (t, C-1,1',5), 128.4 (t, C-11,12,14,15,11',12',14',15'), 127.5 (t, C-2,2',5'), 125.3 (t, C-13,13'), 115.1 (t, C-2,2',5'), 70.3 (s, C-9,9'), 52.7 (s, C-7,7') ppm.

### 3.1.2.14 Dibenzyl-2,2'-(6-methoxy-6'-nitro-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (39)

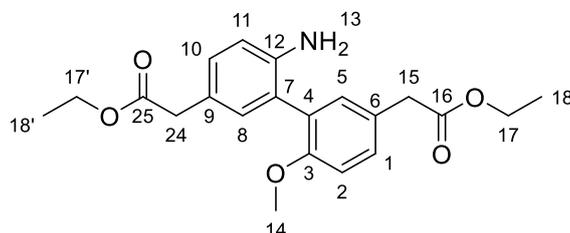


**Variante I:** Das Nitrophenylacetat **33** (100 mg, 0.37 mmol, 1 Äq.), das Methoxyphenylacetat **8** (79.2 mg, 0.044 mmol, 1.2 Äq.) und KO $t$ Bu (102 mg, 0.92 mmol, 2.5 Äq.) wurden in trockenem DMSO (6 mL) gelöst. Die Lösung wurde 8 h bei RT gerührt und mit 2 M HCl-Lösung und EtOAc versetzt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde mit EtOAc vierfach extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde verseift und benzyliert. **Variante II:** Die Darstellung erfolgte nach der Vorschrift für die *one-pot* SUZUKI-MIYAUURA-Kupplung mit der direkten Umesterung zum Dibenzylester. Das Methoxyphenylacetat **11** (100 mg, 0.39 mmol, 1 Äq.) und das Nitrophenylacetat **33** (106 mg, 0.39 mmol, 1 Äq.) wurden jeweils als Substrat I und II eingesetzt. Das Produkt wurde in beiden Ansätze nicht erhalten.

### 3.1.2.15 Dibenzyl-2,2'-(6-amino-6'-methoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (41)



### Diethyl-2,2'-(6-amino-6'-methoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (40)

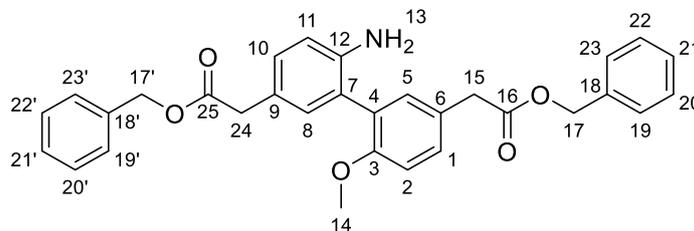


Die Darstellung erfolgte nach der Vorschrift für die *one-pot* SUZUKI-MIYAUURA-Kupplung. Das Methoxyphenylacetat **11** (200 mg, 0.78 mmol, 1 Äq.) und das Bromphenylacetat **32** (189 mg, 0.78 mmol, 1 Äq.) wurden jeweils als Substrat I und II verwendet. Die säulenchromatographische Reinigung (REVELERIS PREP; Kartusche: Reveleris<sup>®</sup> HP Si 12 g; Flussrate: 30 mL/min; PE:EtOAc; Gradient: 0-10 min 0% EtOAc +0.5% Et<sub>3</sub>N, 10-12 min 0-5% EtOAc +0.5% Et<sub>3</sub>N, 12-22 min 5% EtOAc

+0.5% Et<sub>3</sub>N, 22-23 min 5-10% EtOAc +0.5% Et<sub>3</sub>N, 23-25 min 10% EtOAc +0.5% Et<sub>3</sub>N, 25-26.5 min 10-30% EtOAc +0.5% Et<sub>3</sub>N, 26.5-28 min 30% EtOAc +0.5% Et<sub>3</sub>N, 28-29 min 30-50% EtOAc +0.5% Et<sub>3</sub>N, 29-31 min 50% EtOAc +0.5% Et<sub>3</sub>N) ergab das Produkt **40** (44.5 mg, 0.12 mmol, 16%) als dunkelbraunes, viskoses Öl.

**R<sub>f</sub>** = 0.32 (PE:EtOAc = 2:1); **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): 7.28-7.26 (1H, dd, *J* = 2.2 Hz, 8.7 Hz, H-10), 7.17-7.16 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-8), 7.11-7.08 (1H, dd, *J* = 2.1 Hz, 8.2 Hz, H-1), 7.02-7.01 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-5), 6.95-6.93 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-11), 6.76-6.74 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-2), 4.18-4.12 (2H, q, *J* = 7.1 Hz, H-17`), 4.16-4.11 (2H, q, *J* = 7.1 Hz, H-17), 3.79 (3H, s, H-14), 3.58 (2H, s, H-24), 3.52 (2H, s, H-15), 1.28-1.24 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, H-18`), 1.27-1.23 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, H-18) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm): 172.1 (q, C-16), 171.8 (q, C-25), 155.6 (q, C-3), 142.9 (q, C-12), 132.8 (t, C-8), 131.9 (t, C-5), 129.7 (q, C-9), 129.3 (t, C-10), 127.9 (t, C-1), 126.7 (t, C-5), 125.0 (q, C-7), 124.1 (q, C-6), 116.1 (t, C-2), 111.3 (q, C-11), 60.8 (s, C-17`), 60.6 (s, C-17), 55.8 (p, C-14), 40.6 (s, C-15), 40.4 (s, C-24), 14.2 (p, C-18,18`) ppm. **ESI-MS**: ges. [M+H<sup>+</sup>] = 372.1805, gef. [M+H<sup>+</sup>] = 372.1820.

### Dibenzyl-2,2'-(6-amino-6'-methoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (**41**)

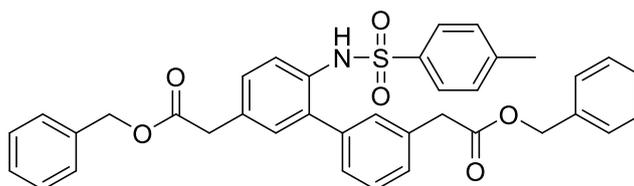


Die Darstellung erfolgte nach der Vorschrift für die *one-pot* SUZUKI-MIYAUURA-Kupplung mit der direkten Umesterung zum Dibenzylester. Das Methoxyphenylacetat **11** (200 mg, 0.78 mmol, 1 Äq.) und das Bromophenylacetat **32** (189 mg, 0.78 mmol, 1 Äq.) wurden jeweils als Substrat I und II verwendet. Die säulenchromatographische Reinigung (REVELERISPREP; Kartusche: Reveleris<sup>®</sup> HP Si 12 g; Flussrate: 30 mL/min; PE:EtOAc + 0.5% Et<sub>3</sub>N; Gradient: 0-10 min 0% EtOAc, 10-12 min 0-5% EtOAc, 12-22 min 5% EtOAc, 22-23 min 5-10% EtOAc, 23-25 min 10% EtOAc, 25-26.5 min 10-30% EtOAc, 26.5-28 min 30% EtOAc, 28-29 min 30-50% EtOAc, 29-31 min 50% EtOAc) ergab den Benzylester **41** (25.0 mg, 0.02 mmol, 2% über vier Stufen) als dunkelbraunes, viskoses Öl.

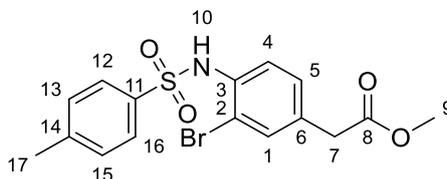
**R<sub>f</sub>** = 0.11 (PE:EtOAc = 2:1); **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): 7.75-7.74 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-1), 7.39-7.38 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-5), 7.37-7.29 (10H, m,

H-19,19',20,20',21,21',22,22',23,23'), 6.89-6.88 (1H, m, H-2), 6.87 (1H, brs, H-8), 6.81-6.78 (1H, m, H-11), 6.77-6.74 (1H, m, H-10), 5.98 (2H, brs, H-13), 5.13-5.12 (4H, brs, H-17), 3.90 (3H, s, H-14), 3.64 (2H, s, H-15), 3.57 (2H, s, H-24) ppm. <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm): 171.6 (q, C-16), 171.6 (q, C-25), 163.7 (q, C-3), 145.7 (q, C-12), 145.6 (q, C-12), 137.7 (t, C-5), 135.8 (q, C-18,18'), 135.8 (q, C-4), 133.6 (t, C-1), 128.5 (t, C-20,20'), 128.2 (t, C-21,21',22,22'), 128.1 (t, C-19,19',23,23'), 128.1 (q, C-6), 127.0 (q, C-9), 126.5 (q, C-7), 120.8 (t, C-10), 115.5 (t, C-8), 110.7 (t, C-11), 110.2 (t, C-2), 66.6 (s, C-17), 66.5 (s, C-17'), 55.9 (p, C-14), 55.6 (p, C-14), 40.6 (s, C-24), 40.2 (s, C-15) ppm. **ESI-MS:** ges. [M+Na<sup>+</sup>] = 518.1938, gef. [M+Na<sup>+</sup>] = 518.1731.

### 3.1.2.16 Dibenzyl-2,2'-(6-((4-methylphenyl)sulfonamido)-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (45)



### Methyl-2-(3-bromo-4-((4-methylphenyl)sulfonamido)phenyl)acetat (42)

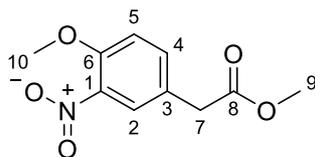


Das Bromophenylacetat **32** (100 mg, 0.41 mmol, 1 Äq.) und Tosylchlorid (95.3 mg, 0.5 mol, 1.2 Äq.) wurden in Pyridin (4 mL) gelöst. Die Lösung wurde 12 h bei 105 °C gerührt. Die abgekühlte Lösung wurde mit 2M HCl und Diethylether versetzt. Die Phasen wurden getrennt. Die wässrige Phase wurde vierfach mit Diethylether extrahiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die Pyridinreste wurden durch mehrfaches Covaporieren mit Toluol vollständig entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung (REVELERISPREP; Kartusche: Reveleris<sup>®</sup> HP Si 12 g; Flussrate: 20 mL/min; PE:EtOAc + 0.5% Et<sub>3</sub>N; Gradient: 0-5 min 2% EtOAc, 5-7 min 2-10% EtOAc, 7-20 min 10% EtOAc, 20-25 min 10-25% EtOAc, 25-35 min 25% EtOAc, 35-37 min 25-45% EtOAc, 37-45 min 50% EtOAc) ergab das Produkt **42** (81 mg, 0.25 mmol, 62%) als hellgelbes Öl.

**R<sub>f</sub>** = 0.68 (PE:EtOAc = 3:1); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): 7.66-7.64 (2H, d, *J* = 8.1 Hz, H-12,16), 7.61-7.59 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-4), 7.36-7.35 (1H, d,

$J = 2.0$  Hz, H-1), 7.23-7.21 (2H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-13,15), 7.19-7.16 (1H, dd,  $J = 2.0$  Hz, 8.3 Hz, H-5), 6.92 (1H, brs, H-10), 3.69 (3H, s, H-9), 3.52 (2H, s, H-7), 2.38 (3H, s, H-17) ppm.  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm): 171.2 (q, C-8), 144.3 (q, C-14), 135.9 (q, C-11), 133.7 (q, C-3), 133.2 (t, C-1), 132.1 (q, C-6), 129.7 (t, C-12,16), 129.6 (q, C-2), 127.3 (t, C-13,15), 122.2 (t, C-4), 115.5 (t, C-5), 55.2 (p, C-9), 39.9 (s, C-7), 21.6 (p, C-17) ppm.

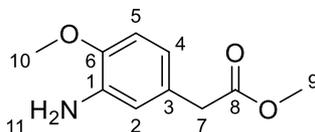
### Methyl-2-(4-methoxy-3-nitrophenyl)acetat (**43**)



Essigsäureanhydrid (67.6 g, 662 mmol, 22 Äq.) wurde auf  $-70$  °C gekühlt und Salpetersäure (90%, 3.7 g, 60.2 mmol, 2 Äq) wurde tropfenweise hinzugefügt. Nach der Zugabe wurde die Lösung 1 h gerührt und langsam auf RT erwärmt. Die Lösung wurde erneut auf  $-70$  °C abgekühlt und das Methyl-2-(4-methoxyphenyl)acetat (**8**, 5 g, 30.1 mmol, 1 Äq.) wurde hinzugefügt. Nach 2 h wurde die Lösung auf  $0$  °C erwärmt, weitere 20 min gerührt, erneut auf  $-70$  °C abgekühlt, mit Wasser versetzt und über 1 h auf RT gebracht. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige mit Methylenchlorid dreifach extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt **43** wurde ohne weitere Charakterisierung in der Folgereaktion zu **44** eingesetzt.

**ESI-MS:** ges.  $[M] = 248.0535$ , gef.  $[M] = 248.0535$ .

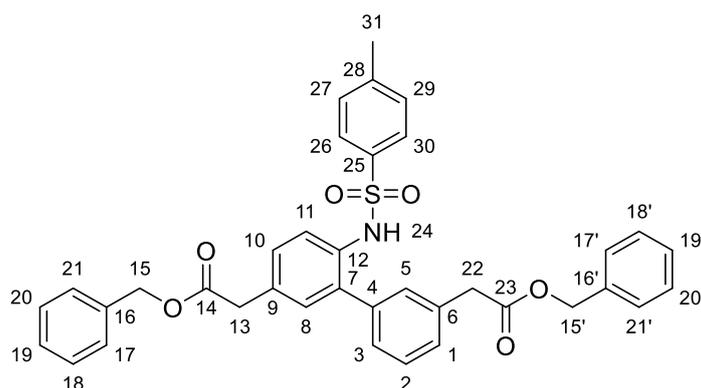
### Methyl-2-(3-amino-4-methoxyphenyl)acetat (**44**)



Das Methyl-2-(4-methoxy-3-nitrophenyl)acetat (**43**) wurde im Rohzustand im vorher entgasten Methanol gelöst und die Lösung wurde mit Pd/C (20% m/m) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 15 h bei RT mit Wasserstoff begast. Die Lösung wurde durch Celite<sup>®</sup> filtriert und mit wenig Ethanol gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 1:1) ergab das Produkt **44** (4.7 g, 24 mmol, 80%) als farbloses Öl.

$R_f = 0.46$  (PE:EtOAc = 1:1);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7.26$  ppm): 6.73 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-5), 6.68 (1H, d,  $J = 1.9$  Hz, H-2), 6.64 (1H, dd,  $J = 8.2$  Hz, 2.0 Hz, H-4), 3.83 (3H, s, H-10), 3.68 (3H, s, H-9), 3.49 (2H, s, H-7) ppm.  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm): 172.6 (q, C-8), 146.8 (q, C-6), 134.2 (t, C-5), 129.5 (q, C-3), 126.7 (t, C-4), 116.2 (t, C-1), 110.6 (t, C-2), 55.7 (p, C-10), 52.1 (p, C-9), 40.8 (s, C-7) ppm. **ESI-MS**: ges.  $[\text{M}+\text{H}^+] = 196.0974$ , gef.  $[\text{M}+\text{H}^+] = 196.0975$

### Dibenzyl-2,2'-(6-((4-methylphenyl)sulfonamido)-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (45)



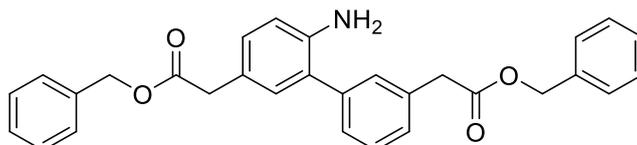
Die Darstellung erfolgte nach der Vorschrift für die *one-pot* SUZUKI-MIYAURA-Kupplung mit der direkten Umesterung zum Dibenzylester. Das Methyl-2-(3-bromophenyl)acetat (**1**, 100 mg, 0.54 mmol, 1 Äq.) und das Phenylacetat **42** (172 mg, 0.54 mmol, 1 Äq.) wurden jeweils als Substrat I und II eingesetzt. Die säulenchromatographische Reinigung (REVELERISPREP; Kartusche: Reveleris<sup>®</sup> HP Si 12 g; Flussrate: 20 mL/min; Eluent: PE:EtOAc +0.5%  $\text{Et}_3\text{N}$ ; Gradient: 0-5 min 2% EtOAc, 5-10 min 2-10% EtOAc, 10-20 min 10-15% EtOAc, 20-30 min 15-25% EtOAc, 30-35 min 25% EtOAc, 35-37 min 25-45% EtOAc, 37-45 min 50% EtOAc) ergab das Produkt **45** (37.8 mg, 0.048 mmol, 19% über vier Stufen) als hellgelbes Öl.

$R_f = 0.73$  (PE:EtOAc = 3:1);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7.26$  ppm): 7.69-7.67 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-11), 7.48-7.46 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-27,29), 7.39-7.28 (10H, m, H-17-21, 17'-21'), 7.25-7.22 (1H, dd,  $J = 2.2$  Hz, 8.1 Hz, H-10), 7.16-7.14 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-26,30), 7.00-6.99 (1H, d,  $J = 2.2$  Hz, H-8), 6.84-6.83 (1H, m, H-3), 6.77-6.73 (3H, m, H-5,1,2), 6.55 (1H, brs, H-24), 5.17 (2H, s, H-15/15'), 5.12 (2H, s, H-15/15'), 3.61 (4H, s, H-13,22) 2.37 (3H, s, H-31) ppm.  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm): 171.2 (q, C-23/14), 170.9 (q, C-23/14), 155.9 (q, C-12), 143.9 (q, C-28), 137.2 (q, C-25), 136.2 (q, C-16/16'), 135.7 (q, C-16/16'), 134.8 (q, C-6/9), 133.7 (q, C-6/9), 132.8 (t, C-5/1/2), 131.2 (t, C-8), 130.4 (t, C-5/1/2), 130.0 (t, C-

5/1/2), 129.7 (t, C-17,21,17',21'/18,20,18',20'), 128.6 (t, C-27,29/26,30), 128.6 (t, C-27,29/26,30), 128.5 (q, C-7), 128.4 (t, C-17,21,17',21'/18,20,18',20'), 128.2 (t, C-19,19'), 127.2 (t, C-10), 121.5 (q, C-3), 116.3 (q, C-4), 114.2 (t, C-11), 66.9 (s, C-15/15'), 66.7 (s, C-15/15'), 41.1 (s, C-22/13), 40.6 (s, C-22/13), 21.5 (p, C-31) ppm.

**ESI-MS:** ges. [M] = 619.2023, gef. [M] = 619.2123.

### Dibenzyl 2,2'-(6-amino-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (46)



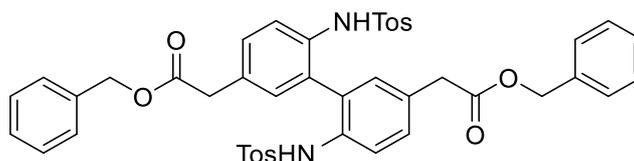
#### Erzeugung von $\text{SmI}_2$

1,4-Diodethan (3.64 g, 13 mmol, Äq.) wurde in trockenem THF gelöst. Sm-Pulver (2.85 g, 45.9 mmol, 3.5 Äq.) wurde der Lösung hinzugefügt. Die Lösung wurde 21 h bei RT gerührt. Die Reaktion ergab eine dunkelblaue 0.2 M  $\text{SmI}_2$ -Lösung.

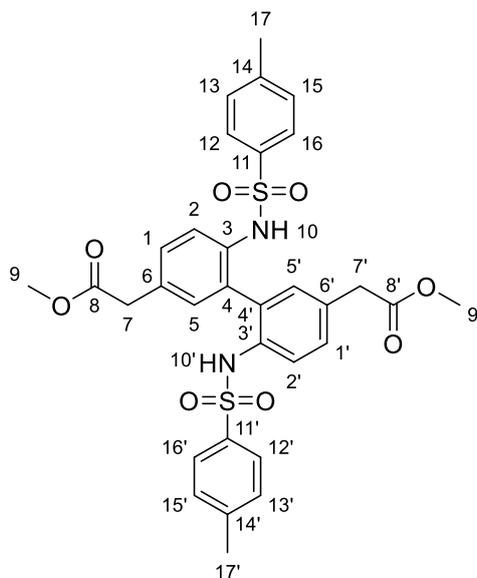
#### Entschützung

Das Diacetat **45** (60 mg, 0.1 mmol, 1 Äq.) wurde in trockenem THF (2 mL) gelöst. Die Lösung wurde mit  $\text{SmI}_2$ -Lösung (8 mL, 1 mmol, 10 Äq) und anschließend mit Wasser (60  $\mu\text{L}$ , 3 mmol, 30 Äq.) sowie Pyrrolidin (180  $\mu\text{L}$ , 2 mmol, 20 Äq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde mit Diethylether verdünnt, mit Natriumkaliumtartrat und gesättigter  $\text{K}_2\text{CO}_3$ -Lösung versetzt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde dreifach mit Diethylether extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die Reaktion ergab nicht das gewünschte Produkt.

### 3.1.2.17 Dibenzyl-2,2'-(6,6'-bis((4-methylphenyl)sulfonamido)-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (48)



### Dimethyl-2,2'-(6,6'-bis((4-methylphenyl)sulfonamido)-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (47)

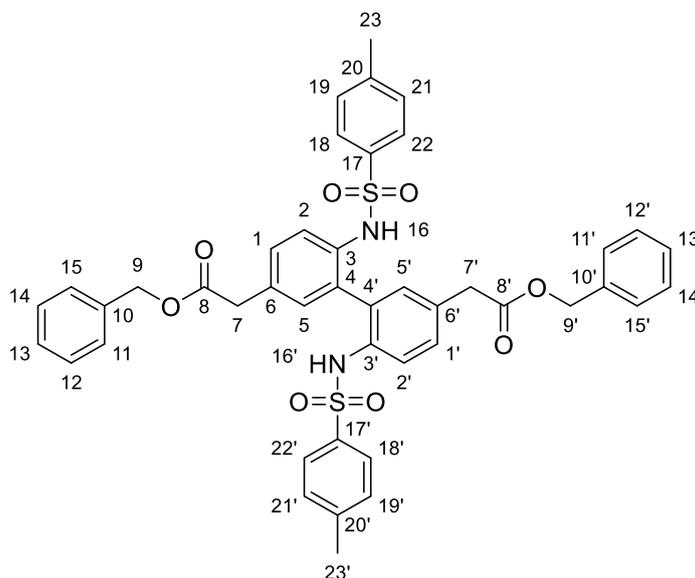


Die Darstellung erfolgte nach der Vorschrift für die *one-pot* SUZUKI-MIYAUURA-Kupplung. Das Phenylacetat **42** (80 mg, 0.25 mmol, 1 Äq.) wurde als Substrat I und II eingesetzt. Die säulenchromatographische Reinigung (REVELERISPREP; Kartusche: Reveleris<sup>®</sup> HP Si 12 g; Flussrate: 20 mL/min; Eluent: PE:EtOAc +0.5% Et<sub>3</sub>N; Gradient: 0-5 min 2% EtOAc, 5-10 min 2-10% EtOAc, 10-20 min 10-15% EtOAc, 20-30 min 15-25% EtOAc, 30-35 min 25% EtOAc, 35-37 min 25-45% EtOAc, 37-45 min 50% EtOAc) ergab das Produkt **47** (50.9 mg, 0.08 mmol, 32% über vier Stufen) als hellgelbes Öl.

$R_f = 0.35$  (PE:EtOAc = 5:1); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): 7.63-7.61 (4H, dt,  $J = 1.9$  Hz, 8.6 Hz, H-13,15,13',15'), 7.24-7.22 (4H, dt,  $J = 1.9$  Hz, 8.6 Hz, H-12,16,12',16'), 6.84-6.83 (2H, d,  $J = 1.9$  Hz, H-5,5'), 6.76-6.74 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-2,2'), 6.65-6.63 (2H, dd,  $J = 1.9$  Hz, 8.1 Hz, H-1,1'), 6.36 (2H, brs, H-10,10'), 3.68 (6H, s, H-9,9'), 3.51 (4H, s, H-7,7'), 2.40 (6H, s, H-17,17') ppm. <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm): 171.7 (q, C-8,8'), 150.5 (q, C-3,3'), 144.3 (q, C-14,14'), 135.0 (q, C-11,11'), 134.1 (q, C-6,6'), 129.7 (t, C-13,15,13',15'), 127.5 (t, C-12,16,12',16'), 125.5 (t, C-2,2'), 121.9 (q, 4,4'), 121.8 (t, C-1,1'), 117.9 (t, C-5,5'),

52.2 (p, C-9,9'), 40.6 (s, C-7,7'), 21.6 (p, C-17,17') ppm. **ESI-MS:** ges.  $[M+H]^+$  = 637.1673, gef.  $[M+H]^+$  = 636.9984.

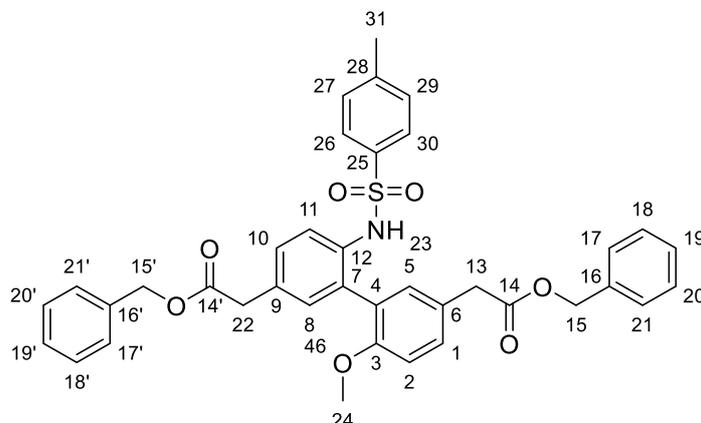
**Dibenzyl-2,2'-(6,6'-bis((4-methylphenyl)sulfonamido)-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (48)**



Die Darstellung erfolgte ausgehend vom Diacetat **47** (50 mg, 0.08 mmol, 1 Äq.) nach der Vorschrift für die Benzylierungsreaktion. Die säulenchromatographische Reinigung (REVELERISPREP; Kartusche: Reveleris<sup>®</sup> HP Si 12 g; Flussrate: 20 mL/min; Eluent: PE:EtOAc +0.5% Et<sub>3</sub>N; Gradient: 0-5 min 2% EtOAc, 5-10 min 2-10% EtOAc, 10-20 min 10-15% EtOAc, 20-30 min 15-25% EtOAc, 30-35 min 25% EtOAc, 35-37 min 25-45% EtOAc, 37-45 min 50% EtOAc) ergab das Produkt **48** (55.2 mg, 0.07 mmol, 83% über vier Stufen) als hellgelbes Öl.

$R_f$  = 0.51 (PE:EtOAc = 3:1); **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): 7.65-7.62 (4H, d,  $J$  = 8.3 Hz, H-19,21,19',21'), 7.37-7.27 (12H, m, H-11-15,11'-15',1,1'), 7.22-7.20 (2H, d,  $J$  = 8.0 Hz, H-5,5'), 7.16-7.14 (2H, d,  $J$  = 8.0 Hz, H-2,2'), 7.02-7.00 (4H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-18,22,18',22'), 6.50 (2H, brs, H-16,16'), 5.11 (4H, s, H-9,9'), 3.59 (4H, s, H-7,7'), 2.38 (6H, s, H-23,23') ppm. **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm): 171.2 (q, C-8,8'), 143.9 (q, C-20,20'), 136.1 (q, C-10,10'), 135.7 (q, C-6,6'), 135.5 (q, C-4,4'), 131.1 (t, C-2,2'), 130.3 (q, C-17,17'), 130.3 (t, C-1,1') 129.7 (t, C-11,15,11'-15'/12,14,12',14'), 128.6 (t, C-11,15,11'-15'/12,14,12',14'), 128.3 (t, C-19,21,19',21'), 128.1 (t, C-1,1'), 127.2 (t, C-18,22,18',22'), 121.8 (t, C-5,5'), 66.7 (s, C-9,9'), 40.6 (s, C-7,7'), 21.6 (p, C-23,23') ppm. **ESI-MS:** ges.  $[M+H]^+$  = 789,2299, gef.  $[M+H]^+$  = 790.2358.

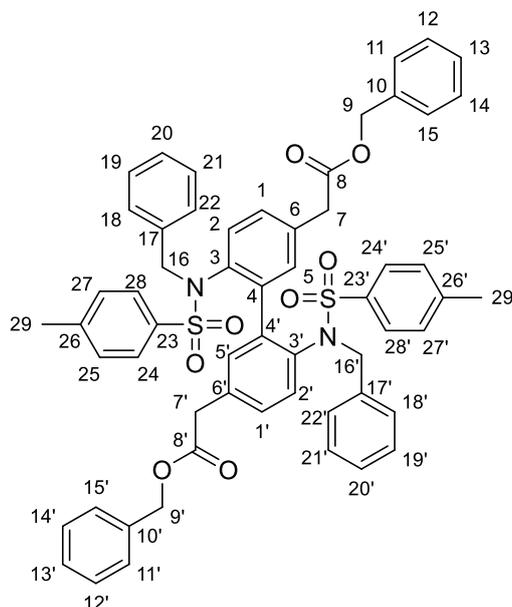
### 3.1.2.18 Dibenzyl-2,2'-(6-methoxy-6'-((4-methylphenyl)sulfonamido)-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (**49**)



Die Darstellung erfolgte nach der Vorschrift für die *one-pot* SUZUKI-MIYAUURA-Kupplung mit der direkten Umesterung zum Dibenzylester. Das Methoxyphenylacetat **11** (50 mg, 0.20 mmol, 1 Äq.) und das Phenylacetat **42** (63.8 mg, 0.20 mmol, 1 Äq.) wurden jeweils als Substrat I und II eingesetzt. Die säulenchromatographische Reinigung (REVELERISPREP; Kartusche: Reveleris<sup>®</sup> HP Si 12 g; Flussrate: 20 mL/min; Eluent: PE:EtOAc +0.5% Et<sub>3</sub>N; Gradient: 0-5 min 2% EtOAc, 5-10 min 2-10% EtOAc, 10-20 min 10-15% EtOAc, 20-30 min 15-25% EtOAc, 30-35 min 25% EtOAc, 35-37 min 25-45% EtOAc, 37-45 min 50% EtOAc) ergab das Produkt **49** (37.8 mg, 0.048 mmol, 19% über vier Stufen) als hellgelbes Öl.

**R<sub>f</sub>** = 0.58 (PE:EtOAc = 4:1); **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): 7.46-7.42 (2H, d, *J* = 8.1 Hz, H-27,29), 7.35-7.27 (10H, m, H-17-21,17'-21'), 7.18-7.14 (2H, d, *J* = 8.2 Hz, H-26,30), 7.12-7.11 (1H, m, H-1), 7.09-7.04 (2H, m, H-10,5), 6.89-6.86 (2H, m, H-8,11), 6.83-6.81 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-2), 5.14 (2H, s, H-15/15'), 5.13 (2H, s, H-15/15'), 4.36 (1H, brs, H-23), 3.88 (3H, s, H-24), 3.65 (2H, s, H-13/22), 3.58 (2H, s, H-13/22), 2.39 (3H, s, H-31) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm): 171.3 (q, C-14), 171.2 (q, C-14'), 154.5 (q, C-3), 142.8 (q, C-28), 136.2 (q, C-25), 133.3 (q, C-12), 132.8 (q, C-9), 132.5 (t, C-1), 131.9 (t, C-8), 131.7 (q, C-6), 130.9 (q, C-16/16'), 130.2 (t, C-5), 129.6 (q, C-16/16'), 129.2 (t, C-26,30/17,29), 128.6 (t, C-17,21,17'-21'/18,20,18'-20'), 128.5 (t, C-17,21,17'-21'/18,20,18'-20'), 128.3 (t, C-26,30/17,29), 128.1 (t, C-10), 126.9 (q, C-7), 126.7 (t, C-19,19'), 124.9 (q, C-4), 121.7 (t, C-11), 111.4 (t, C-2), 66.8 (s, C-15/15'), 66.7 (s, C-15/15'), 52.2 (p, C-24), 40.6 (s, C-13/22), 40.1 (s, C-13/22), 21.4 (p, C-31) ppm. **ESI-MS**: ges. [M+H<sup>+</sup>] = 650.2207, gef. [M+H<sup>+</sup>] = 650.221.

### 3.1.2.19 Dibenzyl-2,2'-(6-((N-benzyl-4-methylphenyl)sulfonamido)-6'-(N-benzylphenylsulfonamido)-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (50)



Die Darstellung erfolgte nach der Vorschrift für die *one-pot* SUZUKI-MIYAURA-Kupplung mit der direkten Benzylierung. Das Phenylacetat **42** (63.8 mg, 0.20 mmol, 1 Äq.) wurde jeweils als Substrat I und II eingesetzt. Um die Umesterung und die Benzylierung von Aminfunktionen herbeizuführen, wurden die Mengen von Benzylbromid und DBU jeweils verdoppelt. Die säulenchromatographische Reinigung (REVELERISPREP; Kartusche: Reveleris<sup>®</sup> HP Si 12 g; Flussrate: 20 mL/min; Eluent: PE:EtOAc; Gradient: 0-5 min 0% EtOAc, 5-15 min 0-10% EtOAc, 15-20 min 10-15% EtOAc, 20-30 min 15-25% EtOAc, 30-35 min 25% EtOAc, 35-37 min 25-45% EtOAc, 37-45 min 50% EtOAc) ergab das gewünschte mehrfach benzylierte Produkt **50** (20 mg, 0.021 mmol, 10% über vier Stufen) als farbloses, viskoses Öl.

$R_f = 0.42$  (PE:EtOAc = 4:1); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): 7.59-7.57 (2H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-2,2'), 7.42-7.22 (24H, m, H-1,1',5,5',11-15,11'-15',18-22,18'-22'), 7.18-7.16 (4H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-25,27,25',27'), 6.99-6.97 (4H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-24,28,24',28'), 5.15 (4H, s, 9,9'), 4.74 (4H, s, H-16,16'), 3.63 (4H, s, H-7,7'), 2.48 (6H, s, H-29,29') ppm. <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm): 170.9 (q, C-8,8'), 143.5 (q, C-26,26'), 138.1 (q, C-17,17'), 136.0 (q, C-23,23'), 135.7 (q, C-10/10'), 135.7 (q, C-10/10'), 133.5 (q, C-6,6'), 129.8 (t, C-25,27,25',27'), 129.5 (t, C-24,28,24',28'), 129.0 (t, C-18,22,18',22',19,21,19',21',12,14,12',14',11,15,11',15'), 128.96 (t, C-1,1'), 128.5 (t, C-20,20'/13,13'), 128.4 (t, C-20,20'/13,13'), 128.3 (q, C-3,3'), 128.1 (q, 4,4'), 127.7 (t, C-5,5'), 127.6 (t, C-2,2'), 66.7 (s, C-9,9'), 54.7 (s, C-

16,16`), 40.8 (s, C-7,7`), 21.6 (p, C-29,29`) ppm. **ESI-MS:** ges.  $[M+H^+] = 969.3238$ , gef.  $[M+H^+] = 969.6782$ .

## 3.2 Enzymatische Monoverseifung

### 3.2.1 Materialien und Chemikalien

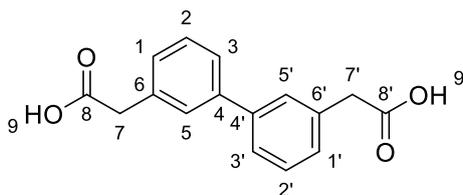
**Tabelle 1: Liste der verwendeten Enzyme.**

Enzymbezeichnung	Units/mg
<i>Aspergillus niger</i>	2.5
<i>Rhizopus oryzae</i>	115
<i>Candida antarctica</i> Lipase B	100.8
<i>Rhizopus niveus</i>	21.45
<i>Candida rugosa</i>	20
Pig pancreas lipase	702
<i>Mucor michei</i>	11.5
<i>Pseudomonas cepacia</i>	300
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	204

### 3.2.2 Vorschrift der enzymatischen Umsetzung

Das jeweilige Enzym (Tabelle 1) (20 bis 25 mg) wird in 0.2 M Natriumphosphatpuffer (pH=7.5-8) suspendiert und der Dimethylester (20 mg in 200  $\mu$ L DMSO, 1.0 Äq.) hinzugefügt (Puffer:DMSO = 1:1). Die Suspension wird 2 bis 24 h bei RT gerührt und mit EtOAc, sowie 2 M NaOH-Lösung versetzt. Phasen werden getrennt und die organische Phase mit 2 M NaOH-Lösung gewaschen. Die vereinten wässrigen Phasen werden dreifach mit EtOAc extrahiert und mit 2 M HCl-Lösung bis pH = 1 angesäuert und erneut mit EtOAc extrahiert. Die so entstandene organische Phase wird mit 0.5 M HCl-Lösung dreifach gewaschen und über  $MgSO_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Die erhaltenen Reste werden in Chloroform aufgenommen und filtriert. Der Filterkuchen wird mit EtOAc gespült. Die Filtrate werden getrennt gesammelt und das jeweilige Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

### 3.2.2.1 2,2'-([1,1'-Biphenyl]-3,3'-diyl)diessigsäure (51)



Die enzymatische Monoverseifung wurde nach der Vorschrift der enzymatischen Umsetzung durchgeführt. Die Diacetate **5** und **6** wurden als Ausgangssubstrate verwendet.

**Tabelle 2: Getestete Lipasen, Bedingungen und Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse.**

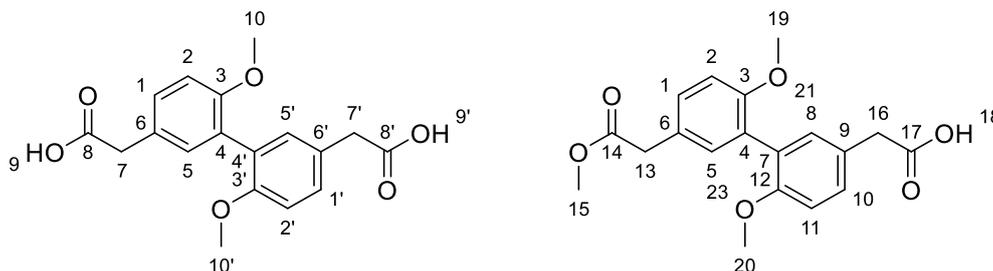
Enzymbezeichnung	t (h)	Y <sub>Me</sub> (%)	Y <sub>Et</sub> (%)	Monoverseifung
<i>Aspergillus niger</i>	24	0	0	-
<i>Rhizopus oryzae</i>	24	32	25	-
<i>Candida antarctica</i> Lipase B	24	11	8	-
<i>Rhizopus niveus</i>	24	35	30	-
<i>Candida rugosa</i>	24	15	15	-
Pig pancreas lipase	24	50	54	-
<i>Mucor michei</i>	24	50	43	-
<i>Pseudomonas cepacia</i>	24	0	0	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	24	20	16	-

t = Zeit; Y = Ausbeute (*yield*)

Die symmetrische Säure **51** wurde als farbloser Feststoff aus dem EtOAc-Filtrat erhalten. Das asymmetrische Produkt wurde nicht erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO = 2.5 ppm): 12.37 (2H, brs, H-9,9'), 7.54-7.52 (4H, m, H-5,5'), 7.43-7.40 (2H, d, *J* = 7.7 Hz, H-1,1'), 7.28-7.25 (2H, dt, *J* = 1.1 Hz, 7.7 Hz, H-2,2'), 3.66 (4H, s, H-7,7') ppm. **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO = 40.0 ppm): 172.9 (q, C-8,8'), 138.2 (t, C-1,1'), 131.6 (t, C-5,5'), 129.2 (t, C-3,3'), 127.1 (t, C-4,4'), 126.4 (q, C-6,6'), 111.1 (t, C-2,2'), 40.3 (s, C-7,7') ppm.

### 3.2.2.2 2,2'-(6,6'-Dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diessigsäure (52) und 2-(2',6-Dimethoxy-5'-(2-methoxy-2-oxoethyl)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)essigsäure (53)



Die enzymatische Monoverseifung wurde nach der Vorschrift der enzymatischen Umsetzung durchgeführt. Das Diacetat **15** wurde als Ausgangssubstrat verwendet.

**Tabelle 3: Getestete Lipasen, Bedingungen und Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse.**

Enzymbezeichnung	t (h)	Y <sub>Me</sub> (%)	Puffer:DMSO	Monoverseifung
<i>Aspergillus niger</i>	24	0	1:1	-
<i>Rhizopus oryzae</i>	24	0	1:1	-
<i>Candida antarctica</i> Lipase B	24	92	1:1	-
<i>Candida rugosa</i>	24	42	1:1	-
<i>Pig pancreas lipase</i>	24	0	1:1	-
<i>Candida antarctica</i> Lipase B	2	30	1:1	-
<i>Candida rugosa</i>	2	30	1:1	-
<i>Candida antarctica</i> Lipase B	24	25	10:1	5:1*
<i>Candida rugosa</i>	24	0	10:1	5:3*

t = Zeit; Y = Ausbeute (yield); \*Verhältnis der symmetrischen und unsymmetrischen Säure im NMR-Spektrum

Die symmetrische Säure **52** wurde als farbloser Feststoff aus dem EtOAc-Filtrat erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO = 2.5 ppm): 12.23 (2H, brs, H-9,9'), 7.21-7.18 (2H, dd, J = 2.4 Hz, 8.5 Hz, H-1,1'), 7.00-6.99 (2H, m, H-5,5'), 6.98 (2H, m, H-2,2'), 3.68 (6H, s, H-10,10'), 3.51 (4H, s, H-7,7') ppm. **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO = 40.0 ppm): 173.5 (q, C-8,8'), 156.1 (t, C-3,3'), 132.2 (t, C-5,5'), 129.8 (t, C-1,1'), 127.7 (t, C-4,4'), 127.0 (q, C-6,6'), 111.7 (t, C-2,2'), 56.0 (p, C-10,10'), 40.9 (s, C-7,7') ppm.

### 2-(2',6-Dimethoxy-5'-(2-methoxy-2-oxoethyl)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)essigsäure (53)

Das gewünschte asymmetrische Produkt wurde im Chloroformfiltrat als Gemisch mit der symmetrischen Säure im Verhältnis 10:1 (Verhältnis der charakteristischen NMR-Signale) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO = 2.5 ppm): 8.99 (1H, brs, H-18), 7.81-7.78 (1H, m, H-8), 7.65-7.55 (2H, m, H-10,11), 6.84-6.82 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5), 6.69-

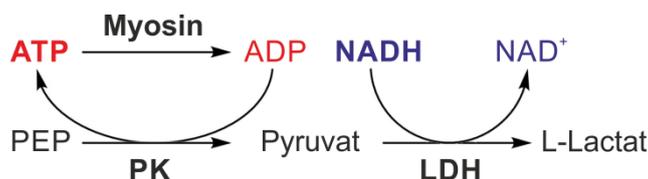
6.68 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-2), 6.63-6.59 (1H, dd,  $J = 2.0$  Hz, 7.9 Hz, H-2), 3.74 (3H, s, H-19/20), 3.63 (2H, s, H-13), 3.61 (3H, s, H-19/20), 3.39 (2H, s, H-16) ppm.

### 3.3 *In vitro* SAR-Untersuchungen

#### 3.3.1 *Steady-state* ATPase Assay

Der inhibitorische Effekt der synthetisierten Substrate wurde in einem NADH-gekoppelten *steady-state* ATPase Assay anhand der Werte der mittleren inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ ) quantifiziert. Die Ermittlung erfolgte an einem Proteinmodell des parasitären Myosin A des *Plasmodium falciparum* (Pf). Das Myosin 1E des *Dictyostelium discoideum* (Dd) wurde in den vorigen Studien der Arbeitsgruppe durch Miriam Weckener im Bereich der inneren *Cleft* an drei Stellen modifiziert: N362L, N402F, F398L (im Folgenden als Trippelmutante M1E bezeichnet)<sup>82</sup>.

Dem *steady-state* ATPase Assay liegt die photometrische Bestimmung der enzymatischen Proteinaktivität anhand der Substratumsetzung zugrunde. Da die ATP-Umsetzung durch Myosin photometrisch nicht quantifizierbar ist, wird ein enzymgekoppelter Assay durchgeführt. Hierzu werden die Enzyme Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase verwendet, die jeweils das Phosphoenolpyruvat unter Verwendung des ADP zum Pyruvat und das entstehende Pyruvat zum L-Lactat mit NADH als Co-substrat umsetzen. Die Abnahme der NADH-Konzentration wird photometrisch bei der Wellenlänge von 340 nm verfolgt (Schema 1).



**Schema 1: Die enzymatische Umsetzung des ATP im *steady-state* ATPase Assay.**

Das Motorprotein Myosin hydrolysiert ATP zu ADP und die Pyruvatkinase (PK) katalysiert die Rückgewinnung von ATP bei der Überführung von PEP in Pyruvat. Pyruvat wird durch die Lactatdehydrogenase in L-Lactat umgewandelt. Dabei wird NADH als Co-Substrat zu NAD<sup>+</sup> umgesetzt, wodurch die Abnahme der Extinktion photometrisch gemessen werden kann.

##### 3.3.1.1 Isolation von Aktin aus Muskelgewebe

Das Aktin wurde aus dem Brustmuskelgewebe des Bankivahuhns (*Gallus gallus*) isoliert und mit Aceton aus einer wässrigen Pufferlösung präzipitiert. Das Hühnerfleisch wurde kommerziell erworben und nach dem Entfernen vom Fettgewebe, Blutkapillaren und Sehnen zerkleinert. Das erhaltene Muskelgewebe (500 g) wurde in dreifacher Menge des eisgekühlten Guba-Straub-Puffers (1.5 L; 0.3 M KCl, 0.1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH=6.5) aufgenommen und 30 min bei 4 °C langsam gerührt. Die Suspension wurde bei 2047 g 30 min zentrifugiert und der Überstand

wurde verworfen. Das Aktin-enthaltende Pellet wurde im fünffachen Volumen des Karbonat-Puffers A (1.5 L; 47.5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>) resuspendiert und 30 min bei 4 °C gerührt. Die Suspension wurde bei 2047 g 30 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde im Karbonat-Puffer B (1.5 L; 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>) resuspendiert und 10 min bei 4 °C gerührt. Die Suspension wurde mit warmem destilliertem Wasser fünffach verdünnt und filtriert. Der Filterkuchen wurde in kaltem Aceton (0.62 mL) aufgenommen, 30 min gerührt und zweimal filtriert. Der erhaltene Filterkucheneinhalt wurde über Nacht getrocknet.

### 3.3.1.2 Präparative Darstellung des G/F-Aktin

Das pulverisierte Aktin (5 g) wurde gemörsert, in den Aktinpuffer (150 mL; 10 mM Tris-HCl, 0.5 mM ATP, 0.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, pH=8.0) bei 4 °C gegeben und 20-30 min gerührt. Die Lösung wurde filtriert und mit wenig Aktinpuffer nachgespült. Das Filtrat wurde bei 104440 g und 4 °C 1 h zentrifugiert. Der Überstand wurde nach Zugabe von KCl (100 mM) und MgCl<sub>2</sub> (2 mM) 1 h bei RT und darauf über Nacht bei 4 °C oder 2-3 h bei RT polymerisiert. Der Inhalt wurde bei 104440 g und 4 °C 3 h zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in den Homogenisator überführt und nach Zugabe des Depolymerisationspuffers (50 mL; 5 mM Tris-HCl, 0.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 0.5 mM ATP, pH=7.5) homogenisiert. Die Aktinlösung wurde über Nacht im Depolymerisationspuffer bei 4 °C unter Rühren dialysiert. Das depolymerisierte Aktin wurde bei 104440 g und 4 °C 1 h zentrifugiert. Das erhaltene globuläre Aktin (G-Aktin) kann durch das gleichmäßige Eintropfen in den flüssigen Stickstoff bei -80 °C eingefroren und gelagert werden.

Zum Erhalten des filamentösen Aktins (F-Aktin) wurde das G-Aktin mit MgCl<sub>2</sub> (2 mM) und KCl (100 mM) versetzt und über Nacht bei 4 °C oder 2-3 h bei RT polymerisiert. Die entstandene F-Aktin-Lösung wurde bei 104440 g und 4 °C 3 h zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das F-Aktin aus dem Pellet erhalten. Das erhaltene F-Aktin wurde vor dem ATPase-Experiment in den MOPS-Puffer (20 mM MOPS, 100 mM KCl, 0.04%(w/v) NaN<sub>3</sub>, pH=7.0) überführt.

### 3.3.1.3 Durchführung des *steady-state* ATPase Experiments

Der Effekt der synthetisierten Verbindungen auf die ATPase-Aktivität von M1E wurde mithilfe einer Titrationsreihe ermittelt. Das Protein wurde mit dem im DMSO gelösten Substrat (maximal 5% DMSO im Ansatz) im ATPase-Puffer zusammengefügt

(250 mM HEPES, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, 0.01% DTT, pH=7.3), 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 13500 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Aktin NADH (400 μM), PEP (500 μM), LDH (100 μM), PK (800 μM) in einer 96-Wellplatte zusammengeführt. ATP (1 μM) wurde unmittelbar vor der Messung in die Ansatzlösung hineingegeben, um die enzymatische Reaktion zu starten. Die Reaktion wurde im MultiscanFC Platerreader der Firma THERMOFISCHER SCIENTIFIC photometrisch verfolgt. Jede Messung wurde zur Kontrolle dreifach durchgeführt und die IC<sub>50</sub>-Werte im Origin2017 bestimmt.

### 3.3.2 MST-Experimente

Die Quantifizierung der Affinität der synthetisierten Verbindungen zur M1E-Tripelmutante erfolgte anhand der Dissoziationskonstante ( $K_D$ ), die mithilfe von *Microscale Thermophoresis* (MST) durch Titration der Inhibitorkonzentration ermittelt wurde. Das Zielprotein wurde durch eine Umsalzungssäule (Zeba™ SpinColumn 7D MWCO; ThermoFisher Scientific, 0.5 mL) in den Labelingpuffer (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH=7.5) überführt und mit dem Fluoreszenz-Dye Atto647 markiert. Der Farbstoff wurde im DMSO gelöst und mit dem Labelingpuffer auf die Proteinkonzentration verdünnt. Die Farbstofflösung wurde 1:1 mit der Proteinlösung vermischt und 30 min bei RT im Dunklen inkubiert. Eine Gelfiltrationssäule (PD MidiTrapG-25; General Electric Healthcare Life Science) wurde mit 8 mL Labelingpuffer gespült. Die inkubierte Labelinglösung wurde auf die Säule aufgetragen und mit 500 μL Labelingpuffer eluiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration auf 10 nM eingestellt. Für die Titrationsexperimente wurden 16 Proben je 20 μM mit unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitors im Thermophoresepuffer (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0.05% Tween-20, 0.5 mg/mL BSA, pH=7.5) angesetzt. Das gelabelte Protein wurde in Anwesenheit des Inhibitors 5 min auf Eis inkubiert. Die jeweilige Probe wurde 5 min bei 14500 g zentrifugiert. Die Messung erfolgte in den Glaskapillaren der Firma NANOTEMPER mit einer spezifischen Innenbeschichtung (*Premium-Coated*). Die Einwirkungsdauer des IR-Lasers auf die Probe wurde auf 30 s und die MST-Power auf 20-40% eingestellt. Das Konzentrationsverhältnis, sowie die Temperaturabhängigkeit des Farbstoffes wurden als normierte Fluoreszenz ( $F_{norm}$ ) im Experiment gemessen. Die Bindungsprozesse wurden im Programm MO Affinity Analysis analysiert und die  $K_D$ -Werte aus der Auftragung der erhaltenen Daten im Origin2017 bestimmt.

### 3.3.3 Parasitäre Experimente

#### 3.3.3.1 Zelluläre Experimente mit *Plasmodium falciparum*

Das inhibitorische Potential der synthetisierten Verbindungen auf die Proliferation und Parasitämie des Malariaparasiten *Plasmodium falciparum* in humanen Erythrozyten wurde im Assay mit den parasitären Stämmen 3D7 (Klon Wildtyp NF54<sup>83</sup>) und 7G8 bestimmt. Die Parasiten wurden in RPMI-Medium (12 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 6 mM D-Glucose, 0.5% (v/v) Albumax, 0.2 mM Hypoxanthin, 0.4 mM Gentamycin, pH=7.2) mit 5% Anteil von humanen Erythrozyten (Blutgruppe 0+, steriles Konzentrat, Blutbank des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf) in 10 mL-Petrischalen und/oder 96-Wellplatten kultiviert. Die Kulturen wurden in einem abgedichteten, zuvor mit einem Gasgemisch (1%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 94%  $\text{N}_2$ ) gespülten Exsikkator bei 37 °C inkubiert. Das Kulturmedium wurde jeden zweiten Tag oder bei einem Trophozoitenanteil von mehr als 5% gewechselt. Die Kultur wurde bei einer Parasitämie von 10% in mehrere Kulturen mit 1%-Parasitämie aufgeteilt.

#### 3.3.3.2 Präparieren und Anfärben von Blutausstrichen

Die parasitäre Zellkultur (1  $\mu\text{L}$ ) wurde auf das Objektträgerglas übertragen und der Tropfen wurde durch leichtes Aufdrücken einer Glaskante verschmiert. Die Ausstriche wurden an der Luft für 30 sec getrocknet und die Blutzellen wurden durch das Eintauchen in Methanol an der Trägeroberfläche fixiert. Die Objektträger mit den Ausstrichen wurden in eine 10%-ige Lösung von Azur-Methylen-Blau (Merck) für 10 min zum Färben eingetaucht und anschließend mit Wasser gespült.

#### 3.3.3.3 Synchronisierung der parasitären Zellen zum Trophozoiten-Stadium

Die parasitären Zellen wurden durch Lyse der infizierten Erythrozyten 16 bis 20 h nach Invasion zum Trophozoiten-Stadium synchronisiert. Die Zellkultur wurde 3 min bei 500 g und 24 °C zentrifugiert. Das fünffache Volumen des vorgewärmten 5%-igen D-Sorbitols in destilliertem Wasser wurde hinzugefügt und 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellkultur wurde resuspendiert und erneut 3 min bei 500 g und 37 °C zentrifugiert. Frisches Medium und Erythrozyten (5%) wurden dem Pellet hinzugefügt. Die Zellkultur wurde bis zum Einstellen von der Trophozoitenmehrheit behandelt.

#### 3.3.3.4 Inhibierung der Parasitämie

Die parasitären Zellkulturen wurden synchronisiert, die Parasitämie sowie der Anteil an Erythrozyten werden jeweils auf 1% und 5% eingestellt. Die Zellkultur (198  $\mu\text{L}$ )

wurde in einer 96-Wellplatte mit 20  $\mu\text{M}$  der im DMSO (1% (v/v)) gelösten Testsubstanz (2  $\mu\text{L}$ ) vermischt und für 24 h inkubiert. Als Negativkontrolle wurden DMSO (1%(v/v)) sowie unbehandelte Parasite verwendet. Die Parasitämie, die Anzahl der Ringe pro Erythrozyt sowie die Anzahl der Schizonten wurde für jede Probe durch Abzählen von parasitären Zellen innerhalb von jeweils 10 Blutaussstrichen ermittelt.

### 3.3.3.5 Fluoreszenz-aktiviertes Zellsortieren (FACS)

Die Quantifizierung der Parasitämie erfolgte an der Apparatur LSRII Flow Cytometer der Firma BIO-RAD. Hierfür wurde eine Zellkulturprobe (20  $\mu\text{L}$ ) mit 80  $\mu\text{L}$  frischen RPMI-Mediums verdünnt und mit 1  $\mu\text{L}$  DHE (0.5 mg/mL Cayman, in DMSO) und 1  $\mu\text{L}$  Hoechst3842 (0.45 mg/mL Chemodex, in DMSO) 20 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. 400  $\mu\text{L}$  FACS STOP Lösung (25% Glutaraldehyd, in RPMI-Medium) wurden unmittelbar vor der Messung der Probe hinzugefügt.

### 3.3.3.6 Assay zur Inhibierung des zellulären Wachstums

Die Zellkulturen wurden synchronisiert und die Parasitämie wurde auf 1% eingestellt. Der Erythrozytenanteil wurde auf 2% eingestellt. Die Zellkultur (198  $\mu\text{L}$ ) wurde in einer 96-Wellplatte mit unterschiedlichen Konzentrationen des im DMSO (1% (v/v)) gelösten Testsubstrats (2  $\mu\text{L}$ ) vermischt und 96 h inkubiert. Die Erythrozyten wurden mit Lysis-Puffer (20 mM TRIS, 5 mM EDTS, 0.008% Saponin, 0.08% Triton-X-100, pH=7.5) lysiert und die parasitäre DNA wird mit SYBR-Gold (Invitrogen, 1:10000) gefärbt. Die Proben werden im Photometer der Firma PerkinElmer (Plate Reader EnVision 2104) bei der Wellenlänge von 485 nm angeregt und die Emission wird bei 535 nm gemessen. Die erhaltenen Daten werden mit Origin2017 analysiert.

### 3.3.4 Bestimmung der Zytotoxizität ( $\text{CC}_{50}$ )

Die Zytotoxizität der Verbindungen wurde an der Zelllinie hcMEC/D3 (primäre Zelllinie der Blut-Hirn-Schranke) bestimmt. Die Experimente wurden unter Verwendung des kolorimetrischen Zellviabilität-Kits I (*Colorimetric Cell Viability Kit I*) der Firma PROMOKINE durchgeführt. Die Zellen wurden im Nährmedium (5% Fötale Kälberserum (FKS), 1.4  $\mu\text{M}$  Hydrocortison, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ascorbinsäure, 10 mM HEPES, 1 ng/mL Basischer Fibroblast-Wachstumsfaktor (bFGF), 1% *Chemically Defined Lipid Concentrate*) bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  kultiviert. Alle Test- und Kontrollproben wurden in dreifacher Ausführung von Julia Weder angesetzt. Die erhaltenen Daten werden mit Origin2017 ausgewertet.

### 3.4 Flashphotolyse

Der Effekt von ausgewählten Inhibitormolekülen auf die Interaktion zwischen Aktin-filamenten und M1E-Trippelmutante wurde durch Flashphotolyse-Experimente untersucht. Im Experimentaufbau wurde eine Quarzküvette (1.5•1.5•20 mm) mit 30  $\mu$ L Probelösung beladen. Die Probe beinhaltete Aktin und Myosin im Probepuffer (25 mM HEPES, 5 mM  $MgCl_2$ , 25 mM KCl, pH=7.3) jeweils in einer Konzentration von 2  $\mu$ M, sowie 2  $\mu$ L cATP (1.33 mM) und unterschiedliche Konzentrationen eines im DMSO vorgelösten Inhibitors. Der DMSO-Anteil wurde im Ansatz bei 2% gehalten. Zur photolytischen Freisetzung von ATP wurde die Küvette mit einem Laserpuls der Wellenlänge 347 nm (Ruby Laser, QSR2/6, LUMONICS LTD) und dem Diameter von 6 mm für 20 ns bestrahlt. Der Laserpuls wurde durch eine Quarzlinse ( $F = 50$  mm) am unteren Fenster der Küvette fokussiert. Zur Detektion von Änderungen in Lichtstreuung wurde die Probe mit einer 100 W Halogenlampe (Xenophot HLX 12 V, OSRAM) bestrahlt und die Aufzeichnung erfolgte bei 405 nm durch einen Photovervielfacher (R376 HAMAMATSU PHOTONICS) in einem Winkel von 90° zur Küvette. Die Aufzeichnung der Lichtübertragung erfolgte bei 405 nm und eine Xe/Hg-Lampe (L2422-02, HAMAMATSU PHOTONICS) mit einem 405 nm Interferenzfilter (SCHOTT) und einem 455 nm Kantenfilter. Die Detektionselektronik beinhaltete zwei Photovervielfacher (LeCroy 9310C, LECROY), die über eine GPIB-Schnittstelle mit einem PC verbunden wurden. Die Aufzeichnung beinhaltete Aufnahme von 50000 Datenpunkten, die nachfolgend zu 560 Punkten einer quasi-logarithmischen zeitlichen Skalierung komprimiert wurden. Die Datenaufnahme und Auswertung erfolgten jeweils in Microcal Origin 4.1 und Origin2017.

### 3.5 *In silico* SAR-Untersuchungen

#### 3.5.1 Erzeugung von Homologiemodellen

Einige der verwendeten Proteinstrukturen stellen kristallographisch ungelöste Strukturen dar. Falls nicht anders angegeben, wurden solche Proteinstrukturen unter Zuhilfenahme strukturell gelöster homologer Proteine modelliert, die eine Sequenzidentität von über 60% aufweisen. Das Strukturmodell von Myosin-9b wurde anhand der Kristallstruktur des humanen Myosin-5c (PDB:4ZG4<sup>84</sup>) mit der Software MODELLER 9.16<sup>85</sup> erzeugt. Die fehlende Aminosäuresequenz von Schleife-2 in Myosin-9b wurde mittels Sequenzanalyse homolog zum *Gg*Myosin-5a (PDB:1W7J<sup>86</sup>) erstellt. Homologiemodell im *post-rigor* Zustand wurde analog zum *Ai*Myosin-S1 (PDB:1SR6<sup>87</sup>) generiert. Die fehlenden Schleifenbereiche der Struktur wurden unter

Verwendung von YASARA4.2<sup>88</sup> nachgebildet. Das Homologiemodell des parasitären Myosin A wurde anhand der Kristallstrukturen von *DdMyosin-2* und *DdMyosin-1e* (PDB:2JJ9<sup>89</sup>; 2MYS<sup>90</sup>; 1LKX<sup>91</sup>) in vorherigen Studien erzeugt und in dieser Arbeit weiter verwendet<sup>82</sup>.

### 3.5.2 Molekulares Protein-Ligand-Docking

Mittels der Methode des molekularen Dockings wurden mögliche Positionen von Inhibitormolekülen in allosterischen Taschen der untersuchten Kristallstrukturen bzw. Homologiemodellen ermittelt. Hierfür wurden AutoDockTools (AutoDock4.0)<sup>92</sup>, SCHRÖDINGER<sup>93,94</sup> verwendet.

#### 3.5.2.1 Allgemeiner Dockingansatz

Die Inhibitorstrukturen wurden im Programm Maestro von SCHRÖDINGER Suites erzeugt, mit Macromodel unter Anwendung des OPL3-Kraftfeldes energieminiert und anschließend mit AutoDockTools vorbereitet. Die Anzahl der freien Torsionen des Liganden wurde, sofern nicht anders angegeben, nicht eingeschränkt. Die Kristallstrukturen bzw. die erzeugten Homologiemodelle wurden durch das Hinzufügen von Wasserstoffatomen und Festlegen einer *GridBox* vorbereitet. In AutoDockTools wurden Protein, Ligand und Dockingparameter festgelegt. Es wurde der Lamarck'sche genetische Algorithmus<sup>92</sup> verwendet, bei dem 20 Läufe pro Inhibitor durchlaufen wurden. Die Anzahl der Populationen pro Lauf, die maximale Anzahl an Wiederholungen und die Generationszahl wurden entsprechend auf 1500,  $10 \cdot 10^{10}$  und 5000 eingestellt. Die Parameter *Cross-Over* und die Mutationsrate wurden entsprechend auf 0.8 und 0.02 festgelegt.

#### 3.5.3 Strukturenssemble-basiertes molekulares Docking

Mit den Myosinen der Klassen 1, 2, 5 und 9 wurden MD-Simulationen über eine Länge von 50 ns in Abwesenheit des Liganden und des Nukleotids durchgeführt. Die Trajektorien der Simulationen wurden einer hierarchischen Clusteranalyse unterzogen, um individuelle Struktur-Ensembles mit unterschiedlichen Konformationen zu generieren. Alle erhaltenen Proteinstrukturen wurden im ProteinPreparationWizard des SCHRÖDINGER Suites<sup>94</sup> und nachfolgend im AutoDockTools<sup>92</sup> prozessiert und für das Docking vorbereitet. Die zu untersuchenden Liganden wurden mit allen erhaltenen Strukturen im AutoDock4.0 kalkuliert. Die gefundenen Positionen des Liganden wurden anhand der RMSD-Werte (*RootMeanSquareDeviation* = die quadratische Wurzel der mittleren Abweichung) gruppiert und untereinander statistisch, sowie

innerhalb der Gruppe energetisch evaluiert, um die wahrscheinlichste sowie energetisch günstigste Positionierung des Liganden zu ermitteln.

### 3.5.4 Molekulardynamische Simulationen

#### 3.5.4.1 Kristallstrukturen und Proteinmodelle

Für die Analyse der spezifischen Inhibierung des Myosin-9b durch das 3,6-Dibromo-1-(hydroxymethyl)carbazol (DBC, **54**) wurden molekulardynamische Simulationen sowohl mit den Myosinstrukturen bzw. erzeugten Homologiemodellen von Myosin-9 in *pre-power-stroke* und *post-rigor* Zuständen als auch verglichen mit Myosinen der Klassen 1, 2 und 5 durchgeführt. Es wurden die *pre-power-stroke* Kristallstrukturen des *DdMyosin-1e* (PDB:1LKX<sup>91</sup>), *DdMyosin-2* (PDB:2JJ9<sup>89</sup>), *HsMyosin-5c* (PDB:4ZG4<sup>84</sup>) und das Homologiemodell des *RnMyosin-9b*, sowie die Kristallstrukturen im *post-rigor* Zustand von *RnMyosin-9b* (PDB:1MMD<sup>95</sup>), *GgMyosin-5a* (PDB:1W7J<sup>86</sup>) und die Homologiemodelle des *DdMyosin-1e* und *RnMyosin-9b* verwendet. Die Simulationen mit dem Homologiemodell des parasitären Myosin A wurden unter Anwendung des Proteinmodells im *pre-power-stroke* Zustand durchgeführt.

#### 3.5.4.2 Durchführung der MD-Simulationen

Die Proteinstrukturen wurden vor der Simulation im ProteinPreparationWizard unter Verwendung des OPLS3-Krauffeldes vom SCHRÖDINGER Suites vorbereitet<sup>94</sup>. Die Bindungsordnungen wurden korrigiert und die fehlenden Wasserstoffatome hinzugefügt. NAMD2.12<sup>96</sup> und das CHARMM36-Krauffeld mit der CMAP-Matrix<sup>97</sup> wurden in allen MD-Simulationen verwendet. Das explizite Wasser wurde durch das TIP3P-Wassermodell beschrieben<sup>98</sup>. Die Temperatur und der Druck wurden konstant bei 310 K und 1 bar unter Verwendung der Langevin-Temperatur- und Kolben-Kupplungsmodelle gehalten. Die weitreichenden elektrostatischen Wechselwirkungen wurden anhand der *particle-mesh*-Methode nach Ewald<sup>99</sup> behandelt, wobei die Maschenweite 1.0 nm betrug. Für die Van-der-Waals- und die Coulomb-Wechselwirkungen wurde das Abstandsmaximum von 12 Å eingestellt. Die solvatisierten und ladungsneutralen MD-Systeme wurden zunächst für mindestens 5 ns energieminiert und equilibriert. Produktionsläufe der Länge von 50 ns wurden unmittelbar im Anschluss an die Equilibrierungsphase mit einem Zeitschritt von 1 fs gestartet.

### 3.5.4.3 Parametrisierung der Inhibitor-Moleküle

Die Parameter der unter Verwendung des OPLS3-Kraftfeldes erzeugten Ligandenstrukturen stimmen mit den Parametern des CHARMM-Kraftfeldes, das bei den MD-Simulationen verwendet wurde, nicht überein. Daher wurden die im Docking erzeugten Strukturen des Liganden durch CgenFF (CHARMMgeneralForceField)<sup>100</sup> neu parametrisiert und konfiguriert.

### 3.5.4.4 Beschleunigte molekulardynamische Simulationen (aMD)

Die beschleunigten (accelerated) molekulardynamischen Simulationen (aMD) wurden mit Myosin-Inhibitor-Komplexen, die aus den molekularen Dockingexperimenten erhalten wurden, unter Verwendung einer auf der Totalenergie basierten Beschleunigungsmethode für 40 ns durchgeführt<sup>101</sup>. Die Methode ermöglicht eine Abschätzung von stabilen und metastabilen Bindungszuständen, sowie den Taschen des Proteins. Aufgrund der Modifizierung der Energiehyperfläche des Proteinsystems wird allerdings keine zeitliche Evaluierung der Bindungsvorgänge und deren Reihenfolge ermöglicht<sup>102</sup>. Die Parameter des Boostpotentials wurden aus den kurzen (5 ns) klassischen MD-Simulationen nach den Formel 1 und Formel 2 ermittelt<sup>101</sup>.

$$E_{total} = V_{total} + 0.175 \cdot N_{Atome} \quad \text{Formel 1}$$

$$\alpha = 175 \cdot N_{Atome} \quad \text{Formel 2}$$

Jeweils mit  $E_{total}$  = die Referenzenergie,  $V_{total}$  = mittlere Potentialenergie des Systems,  $N_{Atome}$  = Anzahl der Atome im System,  $\alpha$  = Beschleunigungsfaktor.

### 3.5.4.5 Ermittlung der freien Bindungsenergie nach der LIE-Methode

Mittels NAMDEnergy-Tool aus VMD wurden die jeweiligen mittleren Energien der Van-der-Waals- und elektrostatischen Wechselwirkungen ermittelt, die aus den Trajektorien der MD-Simulationen mit dem Protein-Ligand-Komplex und dem Liganden in der wässrigen Umgebung erhalten wurden. Die freie Interaktionsenergie wurde durch die Bildung der Summe von Differenzen der mittleren Energien der beiden Zustände des Liganden (gebunden und ungebunden) errechnet (Formel 3).

$$\Delta G = \beta \cdot (\langle V_{elek.} \rangle_{geb.} - \langle V_{elek.} \rangle_{ungeb.}) + \alpha \cdot (\langle V_{dW} \rangle_{geb.} - \langle V_{dW} \rangle_{ungeb.}) + \gamma \quad \text{Formel 3}$$

Mit  $\Delta G$  = freie Bindungsenergie/Gibbs-Energie;  $\beta$  /  $\alpha$  /  $\gamma$  = Korrekturparameter der Beiträge;  $\langle V_{elek.} \rangle_{geb./ungeb.}$  = die elektrostatische Energie im gebundenen/ungebundenen Zustand;  $\langle V_{dW} \rangle_{geb./ungeb.}$  = die Van-der-Waals-Energie im gebundenen/ungebundenen Zustand.

Für die Berechnung wurden die Parameter mit den folgenden Werten verwendet:  $\beta = 0.43$ ;  $\alpha = 0.18$ ;  $\gamma = 0$ . Der Parameter  $\beta$  hat von allen drei Parametern die höchste Abhängigkeit vom Ligandencharakter und der Beschaffenheit seiner funktionellen Gruppen. Es wurden die Korrekturen des Wertes von  $\beta$  unter Berücksichtigung der funktionellen Gruppen verwendet (Tabelle 4)<sup>103</sup>.

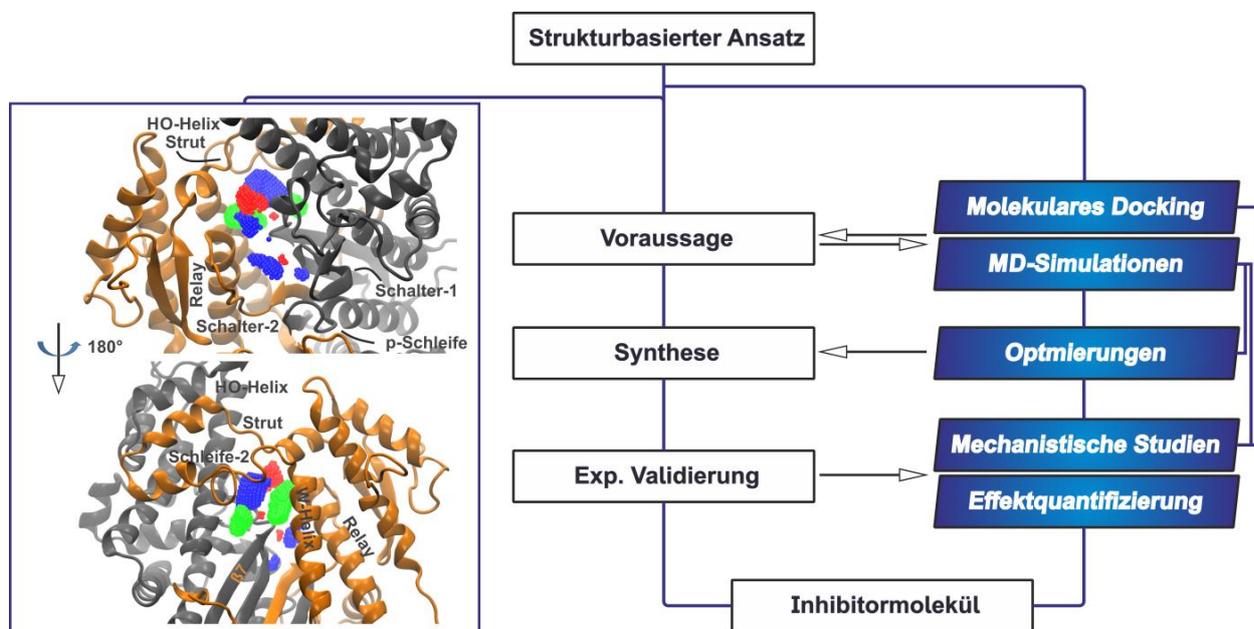
**Tabelle 4: Korrekturfaktoren des Parameters  $\beta$  für die Bestimmung der freien Bindungsenergie.**

<b>Funktionelle Gruppe</b>	<b><math>\beta_0 - \beta</math></b>
Neutral	$\beta_0 = 0.43$
Alkohole	$\beta_0 - (n \cdot 0.06/n) = 0.37$
Amine	$\beta_0 - (n \cdot 0.04/n) = 0.39$
Säuren	$\beta_0 - (n \cdot 0.03/n) = 0.40$
Gemischte	$\beta_0 - ((n\beta_1 + n\beta_2)/N)$

$\beta_0$ =Ausgangsfaktor;  $\beta$ =Korrekturfaktor; n=Anzahl der bei der Korrektur berücksichtigten gleichen funktionellen Gruppen; N=die Gesamtzahl der berücksichtigten funktionellen Gruppen.

## 4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der inhibitorische Effekt von potentiellen biarylischen Inhibitoren gegenüber dem Myosin A des Malariaparasiten *Plasmodium falciparum* über gezielte Modifikationen verstärkt. Die Modifikationen wurden anhand von vorhandenen Erkenntnissen über die Bindestelle des Grundkörpers in der polar asymmetrischen allosterischen Tasche des Zielproteins, die von Preller *et al.* lokalisiert wurde<sup>75,82</sup>, mithilfe der *in silico* Methoden des molekularen Dockings und MD-Simulationen ausgearbeitet (Abbildung 8). Die Verbindungen mit den abgeleiteten Modifikationen wurden synthetisiert und auf ihr inhibitorisches Potential gegenüber einem Myosin A-Modell *in vitro* über ATPase- und MST-Experimente untersucht. Die anschließende Untersuchung des Effektes auf die Glideosom-abhängige Prozesse der Wirtszellinvasion und des *Egress* wurden mit parasitären *Pf*-Stämmen 3D7 und 7G8 durchgeführt. Aus den erhaltenen Erkenntnissen über die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der synthetisierten Biaryle sowie den Flashphotolyse-Experimenten wurden Folgerungen über den potentiellen Mechanismus der inhibierenden Wirkung abgeleitet (Abbildung 8). Weiterhin wurden die strukturellen Hintergründe der Aktivität eines anderen Myosin-Inhibitors, des 3,6-Dibromo-1-(hydroxy-methyl)carbazol (DBC, **54**) gegenüber *Rn*Myosin-9b unter Verwendung von strukturbasiertem Ansatz untersucht.

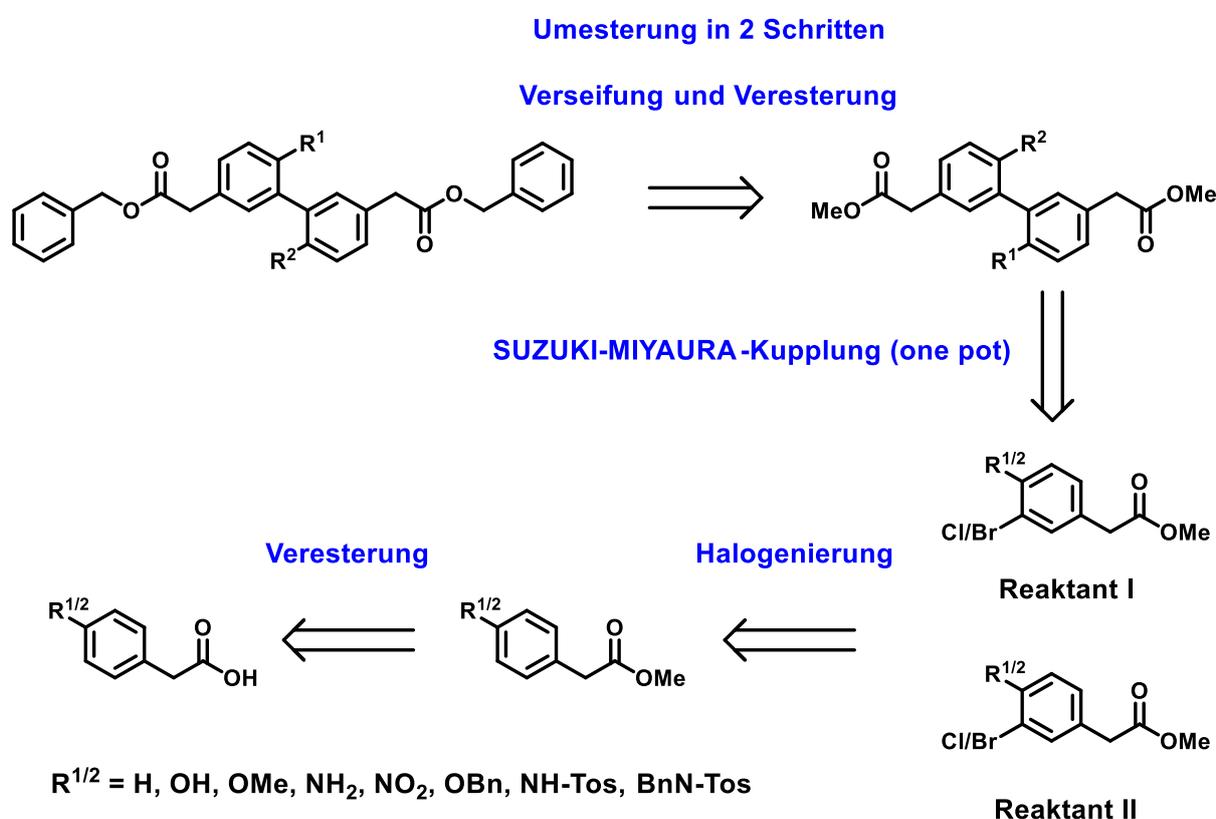


**Abbildung 8: Lokalisierung und polare Eigenschaften der allosterischen Tasche im parasitären Myosin A mit schematischer Darstellung der Methode des in der Arbeit verwendeten strukturbasierten Ansatzes.**

Strukturelle Information zum Zielprotein Myosin A (Homologiemodell links). Obere (grau) und untere (orange) 50-kDa-Domänen. Die Nukleotidbindestelle im Bereich der Nukleotidbindeelemente: p-Schleife, Schalter-1 und -2. Strukturbasierter Ansatz in der vorliegenden Arbeit: *in silico* Kalkulationen der Affinität der Biaryle, Synthese und *in vitro* Validierung des Effektes (mittlerer Abschnitt). Die Inhalte der einzelnen Abschnitte und ihre Verknüpfung untereinander sind im rechten Teil des Schemas dargestellt.

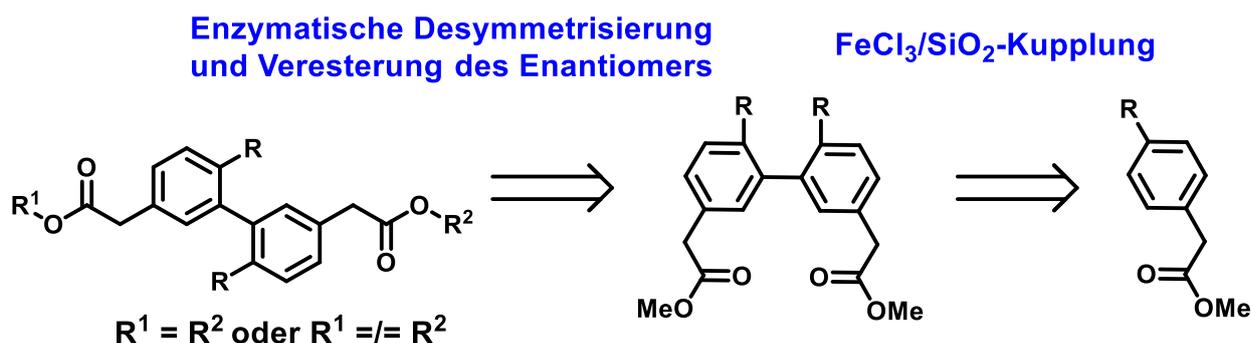
#### 4.1 Synthesen der Biarylderivate

Zur Synthese der potentiellen Inhibitormoleküle wurden zwei unterschiedliche Ansätze angewendet. Der erste Ansatz basiert auf der *one-pot* Variante der Pd-katalysierten SUZUKI-MIYAUURA-Kreuzkupplung nach Molander *et al.*<sup>104</sup>. In diesem Ansatz wird die C-C-Bindung zwischen zwei halogenierten Reaktanten zur Erzeugung des biarylischen Grundkörpers aufgebaut. Im ersten Schritt der Reaktion wird aus einem Reaktanten eine Boronsäure *in situ* erzeugt, die im zweiten Schritt ohne Isolierung oder sonstige Aufarbeitungsschritte mit dem zweiten Reaktanten umgesetzt wird. Das so erzeugte symmetrische oder asymmetrische Biaryl wird verseift, aufgearbeitet und zum Benzylester umgesetzt (Schema 2).



**Schema 2: Retro-synthetische Darstellung des Syntheseweges mittels SUZUKI-MIYAUURA-Kupplung.**

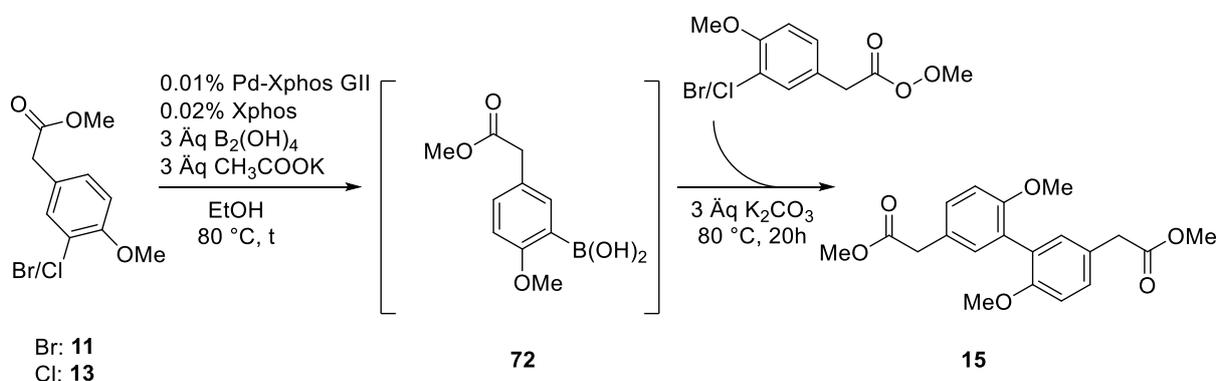
Ebenfalls wurde der Zugang zu Biarylderivaten über einen biomimetischen Ansatz der Eisenchlorid/Siliciumdioxid-vermittelten oxidativen Kupplung getestet, da die biarylischen Metabolite in Pflanzen über einen oxidativen Prozess unter Sauerstoffbeteiligung generiert werden<sup>75</sup>. Die Lipasen-katalysierte hydrolytische Esterspaltung wurde vorrangig als potentieller Zugang zu asymmetrischen Biarylen geprüft (Schema 3).



Schema 3: Retro-synthetische Darstellung des biomimetischen Syntheseweges mit hydrolytischer Mono-verseifung durch Spaltung von Esterfunktionen durch Lipasen.

#### 4.1.1 Optimierung der *one-pot* SUZUKI-MIYAUURA-Kreuzkupplung

Die *one-pot* SUZUKI-MIYAUURA-Kreuzkupplung wurde als Schlüsselschritt für einen effizienten Zugang zu den potentiellen Inhibitoren des parasitären Myosin A gewählt. Der Buchwald Pd-Katalysator der zweiten Generation (Pd-XPhos GII) wurde bei dem Reaktionsansatz verwendet. Um die Reproduzierbarkeit und Produktivität der Reaktion zu gewähren, wurden die Bedingungen der Reaktionsführung für das System optimiert. Hierfür wurde die *in situ*-Erzeugung der freien Boronsäure, sowie ihre darauffolgende Umsetzung mit dem zweiten, halogenierten Reaktanten und der Einfluss des im jeweiligen Schritt verwendeten Halogenatoms, sowie des Lösungsmittels untersucht (Schema 4).



Schema 4: *One-pot* SUZUKI-MIYAUURA-Kreuzkupplung als Schlüsselschritt zur Synthese von potentiellen Inhibitoren des parasitären Myosin A am Beispiel der Synthese des Vorläufermoleküls 15.

Bei den Ansätzen mit unterschiedlichen Lösungsmitteln wie Ethanol, Methanol und Tetrahydrofuran (THF) wurde das Produkt im Ethanol in einer Ausbeute von 20% erhalten. Im Methanol und THF wurde das Produkt in Spuren erhalten (Tabelle 5). Das Ersetzen einer wässrigen, entgasten Lösung der stärkeren Base (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) im zweiten Schritt der Reaktion durch das trockene K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> im festen Aggregatzustand ergab eine Verbesserung der Ausbeute bis zu 32% (Tabelle 5). Die isolierte Betrachtung des ersten Reaktionsschrittes und die massenanalytische Untersuchung der

Eduktmengenabnahme ergab ein Erkenntnis über die Umsetzung des Eduktes zur freien Boronsäure. Die optimale Zeit der Eduktumsetzung lag dabei im Bereich von 30 - 40 min. Bei längerer Rührzeit wurde die Entstehung eines Zersetzungsproduktes der Boronsäure und der Dehalogenierung beobachtet. Die Verkürzung der Reaktionszeit ergab eine Produktausbeute von 65% (Tabelle 5). Die Verwendung der schwächeren Base KF ( $pK_b$  von 9.3 auf 10.9) oder der stärkeren Base  $\text{KHCO}_3$  anstelle von Kaliumacetat führte allerdings zu keiner Verbesserung der Produktbildung (Tabelle 5).

Der Überschuss an Ethanol und die Verwendung der Basen in den beiden Schritten der SUZUKI-MIYAURA-Reaktion begünstigten eine Umesterungsreaktion. Die Umesterung zum Diethylester wurde bei der Überschreitung der Menge an Kaliumkarbonat von 3 Äq. herbeigeführt und konnte dadurch kontrolliert werden. Eine Erhöhung der Menge von Kaliumacetat im ersten Schritt der Reaktion, sowie die Verwendung der wässrigen  $\text{K}_2\text{CO}_3$ -Lösung hatten keinen Effekt auf die Umesterungsreaktion.

**Tabelle 5: Optimierung der one-pot SUZUKI-MIYAURA-Kreuzkupplung hinsichtlich des Lösungsmittels und der *in situ* Generierung der Boronsäure.**

Lösungsmittel	Base	Boronsäure	<i>t in situ</i> (h)	Y (%)
Ethanol	KOAc/ $\text{K}_2\text{CO}_3$ (aq)	$\text{B}_2(\text{OH})_4$	20	20
Methanol	KOAc/ $\text{K}_2\text{CO}_3$ (aq)	$\text{B}_2(\text{OH})_4$	20	Spuren
THF	KOAc/ $\text{K}_2\text{CO}_3$ (aq)	$\text{B}_2(\text{OH})_4$	20	Spuren
Ethanol	KOAc/ $\text{K}_2\text{CO}_3$ (s)	$\text{B}_2(\text{OH})_4$	20	32
Ethanol	KOAc/ $\text{K}_2\text{CO}_3$ (s)	$\text{B}_2(\text{OH})_4$	1	45
Ethanol	KOAc/ $\text{K}_2\text{CO}_3$ (s)	$\text{B}_2(\text{OH})_4$	0.5	65
Ethanol	KF/ $\text{K}_2\text{CO}_3$ (s)	$\text{B}_2(\text{OH})_4$	0.5	5
Ethanol	$\text{KHCO}_3$ / $\text{K}_2\text{CO}_3$ (s)	$\text{B}_2(\text{OH})_4$	0.5	Spuren

aq=wässrige Lösung; s=fester Aggregatzustand; Y=yield(Ausbeute)

Die verbesserten Bedingungen wurden für die Optimierung des zweiten Schrittes der SUZUKI-MIYAURA-Kreuzkupplung verwendet. Hierbei wurden die Zugänge zu unterschiedlich funktionalisierten Produkten getestet, um den Einfluss der funktionellen Gruppen auf das Gelingen der Kreuzkupplung zu prüfen (Tabelle 6). Der chlorierte Vorläufer für die *in situ* Generierung der Boronsäure bei der Synthese vom Diacetat **5** steigerte die Ausbeute um 40% im Vergleich zur Reaktion mit bromiertem Derivat (Tabelle 6, Zeilen 1 und 2). Variation der Reihenfolge sowie der Halogenierungsart ergab bei der Synthese des asymmetrischen Diacetats **73** kein Produkt (Tabelle 6, Zeilen 3-6). Die Verwendung des bromierten Hydroxyphenylacetats **10** in der Umsetzung mit dem Methoxyderivat **11** ergab ebenfalls kein Produkt (Tabelle 6, Zeile 7).

Dimethyl-2,2'-(6-hydroxy-6'-methoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (**75**) konnte durch den Einsatz des halogenierten Hydroxyphenylacetates **14** im zweiten Schritt der Reaktion erhalten werden. Die Ausbeute lag allerdings bei 7% und die Reinigung wurde durch das Auftreten von Nebenprodukten der Dehalogenierungsreaktion beider Edukte erschwert (Tabelle 6, Zeile 8). Eine freie Hydroxyfunktion könnte hier möglicherweise als Katalysatorgift fungieren und dadurch möglicherweise eine Dehalogenierung der bromierten Edukte begünstigen. Zum Erhalten von hydroxyfunktionalisierten Biarylen wurde die Funktion deshalb mit einer TBDMS-Gruppe geschützt.

**Tabelle 6: Optimierungsansätze zur one-pot SUZUKI-MIYAUURA-Kreuzkupplung.**

N	Reaktant I	Reaktant II	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Diacetat N	Y (%)
1	Br	Cl	H	H	<b>5</b>	50
2	Cl	Br	H	H	<b>5</b>	90
3	Cl	Br	OH	H	<b>73</b>	k.U.
4	Cl	Cl	OH	H	<b>73</b>	k.U.
5	Br	Cl	OH	H	<b>73</b>	k.U.
6	Cl	Br	H	OH	<b>73</b>	k.U.
7	Br	Br	OH	OMe	<b>75</b>	k.U.
8	Br	Cl	OMe	OH	<b>75</b>	7
9	Cl	Br	H	OMe	<b>74</b>	10
10	Br	Cl	OMe	H	<b>74</b>	23
11	Br	Br	OMe	OMe	<b>15</b>	70

Y=yield (Ausbeute); k.U.=keine Umsetzung

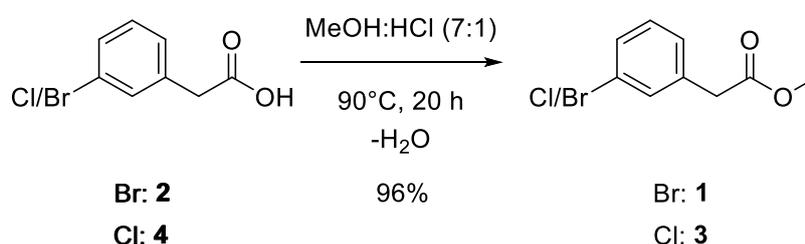
Bei der Synthese des Diacetats **74** erwies sich das chlorierte Phenylacetat **3** im ersten Schritt der Reaktion in Kombination mit dem Methoxyphenylacetat **11** als ungünstig, da die Ausbeute bei der Verwendung der Edukte in umgekehrter Reihenfolge verdoppelt wurde (Tabelle 6, Zeilen 9 und 10). Das symmetrische, methoxyfunktionalisierte Biarylderivat **15** wurde unter Verwendung vom bromierten Edukt **11** in beiden Schritten der Reaktion mit einer Ausbeute von 70% erhalten (Tabelle 6, Zeile 11).

Die durchgeführten Testexperimente erlauben zwar keine eindeutige Aussage über die Vorteile der Verwendung des chlorierten bzw. des bromierten Derivates im jeweiligen Schritt der Reaktion, ergaben jedoch wichtige Erkenntnisse über das Lösungsmittel, die Kontrolle der Umesterungsreaktion, die Reaktionszeit bei der *in situ* Generierung der Boronsäure, sowie über die störenden Effekte der freien OH-Gruppe in jedem Schritt der Reaktionsführung.

## 4.1.2 Synthesen der Biaryl-derivate

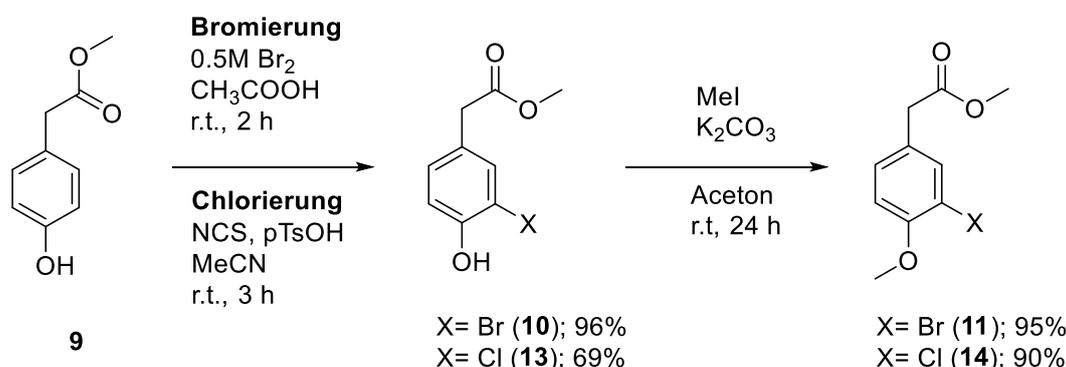
### 4.1.2.1 Synthese von Fragmenten der SUZUKI-MIYAURA-Kreuzkupplung

Die Vorläufer der *ortho*-funktionalisierten Biaryle wurden über die SUZUKI-MIYAURA-Kreuzkupplung aus zwei halogenierten Fragmenten synthetisiert (Schema 2). Die Synthesen von Fragment **1** und **3** erfolgten ausgehend von den entsprechenden freien Säuren **2** und **4**. In einer Veresterungsreaktion unter Verwendung eines Gemisches aus Methanol und konzentrierter Salzsäure wurden die Verbindungen **1** und **3** in nahezu quantitativer Ausbeute erhalten (Schema 5).



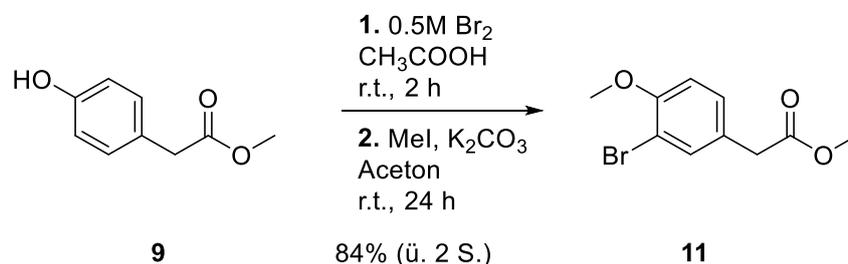
Schema 5: Methylierungsreaktion zur Erzeugung der SUZUKI-MIYAURA-Fragment **1** und **3**.

Die Synthese der chlorierten und bromierten hydroxy- sowie methoxyfunktionalisierten Fragmenten **10**, **13**, **11** und **14** erfolgte ausgehend vom Hydroxyphenylacetat **9**, welches im ersten Schritt der Synthesefolge entweder über eine elektrophile aromatische Substitution unter Verwendung einer 0.5 M Brom-Lösung in sauren Bedingungen bromiert oder über die *in situ* Generierung des Chlorierungsreagenzes aus *N*-Chlorosuccinimid (NCS) und aktivierender *para*-Toluolsulfonsäure chloriert wurde. Die Reaktionen ergaben die jeweiligen Produkte in Ausbeuten von 96% und 69%. Die so erzeugten Hydroxyhalogenide wurden unter Verwendung von Methyljodid unter sehr milden Bedingungen und nahezu quantitativen Ausbeuten an der Hydroxygruppe methyliert (Schema 6).



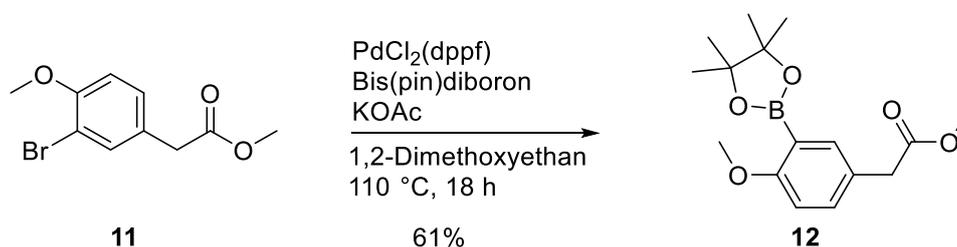
Schema 6: Reaktionsfolge zur Darstellung von SUZUKI-MIYAURA-Fragmenten **10**, **13**, **11** und **14**.

Für den Zugang zum Methoxyphenylacetat **11** wurde ebenfalls ein Ansatz getestet, in dem die beiden Syntheseschritte vereint wurden. Das Produkt **11** wurde hierbei in einer kürzeren Zeit und einer Ausbeute von 84% erhalten (Schema 7).



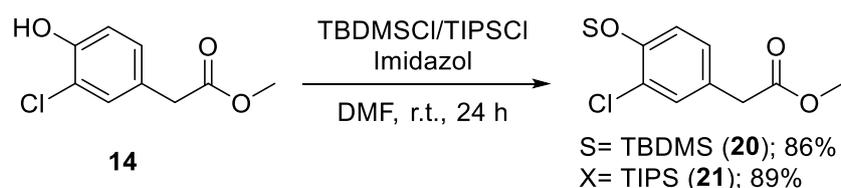
**Schema 7: Alternative Darstellung des Methoxyphenylacetats **11** über einen *one-pot* Darstellungsansatz.**

Zum Vergleich der Verwendung einer geschützten anstelle der freien Boronsäure im *one-pot* SUZUKI-MIYAUURA-Ansatz wurde das Methoxyphenylacetat **11** in das stabile Pinacol-Boron **12** unter Verwendung von PdCl<sub>2</sub>(dppf) und Bis(pinacolato)diboron in trockenem und entgastem 1,2-Dimethoxyethan mit einer Ausbeute von 61% überführt (Schema 8). Die Verwendung von Bis(pinacolato)diboron anstelle von B<sub>2</sub>(OH)<sub>4</sub> ergab allerdings keine Verbesserung des Umsatzes und wurde nicht weiter verfolgt.



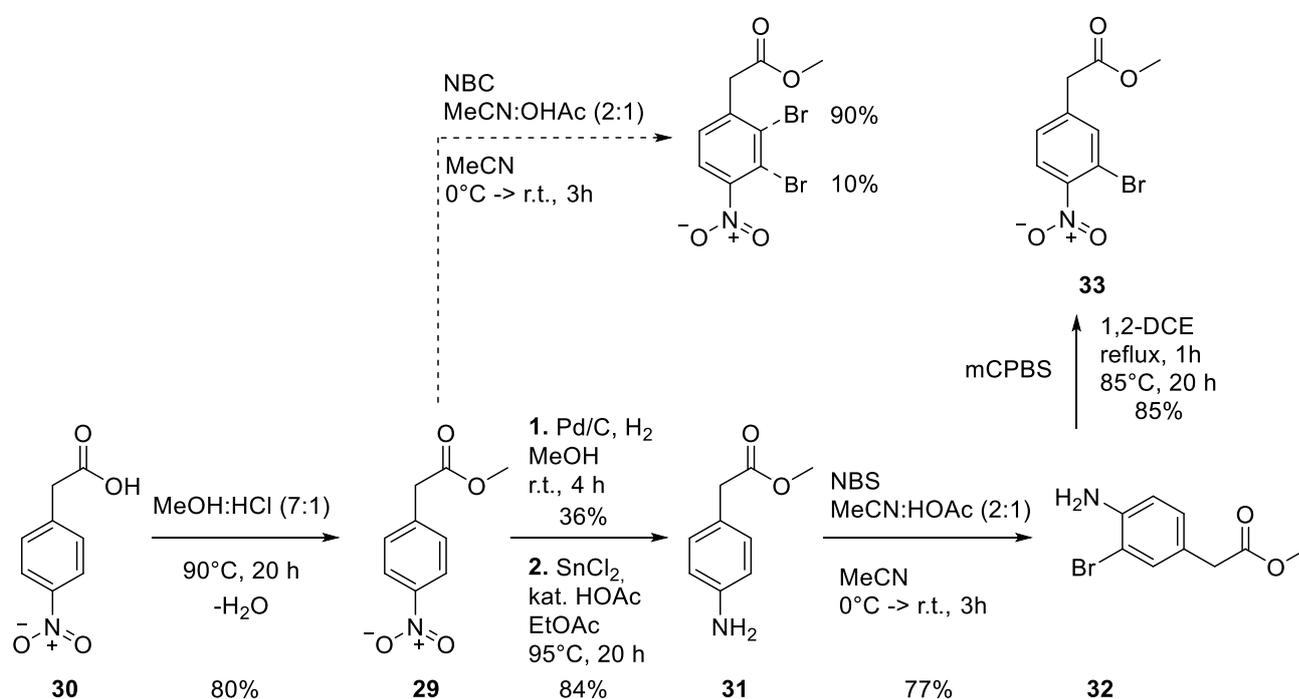
**Schema 8: Darstellung des Pinacol-Borons **12** zur Ermittlung einer alternativen Boronquelle für die *one-pot* SUZUKI-MIYAUURA-Kupplung.**

Zum Schützen der freien Hydroxyfunktion des Derivates **14** wurden unter basischen Bedingungen stabile TBDMS- und TIPS-Gruppen verwendet. Die Funktionalisierungsreaktionen wurden unter Verwendung des jeweiligen Chlorosilans (TBDMSCl und TIPSCl) in Anwesenheit von Imidazol durchgeführt. Die gewünschten Produkte **20** und **21** wurden in Ausbeuten von 86% und 89% erhalten (Schema 9).



**Schema 9: Darstellung der Fragmente **20** und **21** mit Silan-geschützter Hydroxyfunktion für die SUZUKI-MIYAUURA-Kreuzkupplung.**

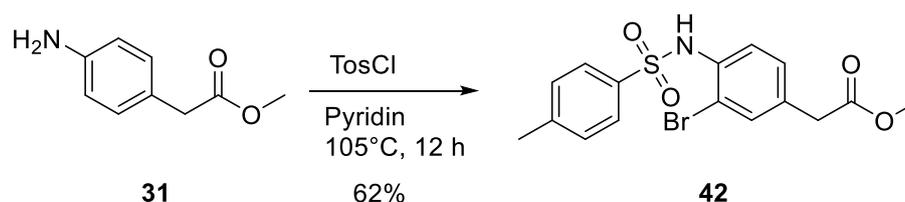
Als Ausgangssubstanz für die Synthese der nitro- und aminfunktionalisierten Fragmente **32** und **33** wurde 2-(4-Nitrophenyl)essigsäure (**30**), die im ersten Reaktionsschritt im Methanol-Salzsäure-Gemisch verestert wurde, verwendet (Schema 10). Im Weiteren wurde die Verbindung **29** zum entsprechenden Amin **31** reduziert. Eine direkte Halogenierungsreaktion des dem Substrats mit der NO<sub>2</sub>-Gruppe als Erstsубstituenten begünstigt aufgrund der -M- und -I-Effekte die Entstehung des *meta*-halogenierten Produktes mit einem theoretischen Verhältnis *ortho:meta* von 1:9. Daher wurde das nitrofunktionalisierte Derivat **29** zunächst zum entsprechenden Amin **31** reduziert. Die Reduktion wurde auf zwei unterschiedliche Weisen durchgeführt. Unter Verwendung von Pd/C-aktiviertem Wasserstoff als Reduktionsmittel wurde das Produkt **31** mit einer Ausbeute von 36% erhalten. Durch einen Reduktionsansatz mit Zinnchlorid (SnCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O), konnte die Produktausbeute auf 84% verbessert werden (Schema 10). Die Umsetzung des erhaltenenamins **31** mit NBS ergab das entsprechende aminfunktionalisierte Brombenzol **32**, welches unter Verwendung von *meta*-Chlorperbenzoesäure (mCPBS) zum nitrofunktionalisierten Brombenzol **33** oxidiert wurde (Schema 10).



Schema 10: Darstellungsrute der NO<sub>2</sub>- und NH<sub>2</sub>-funktionalisierten Fragmente **32** und **33** für die SUZUKI-MIYAUURA-Kreuzkupplung.

Zur Erhöhung der sterischen Überfrachtung in der *ortho*-Position des biarylischen Grundgerüsts wurde diese mit Benzyloxy-, Aminotosyl- und *N*-Benzyl-*N*-Tosylgruppen funktionalisiert. Die Benzyloxy- und *N*-Benzyl-*N*-Tosylgruppen wurden

durch den finalen Benzylierungsschritt bei der Umesterungsreaktion eingeführt. Die Aminotosylierung erfolgte über zwei Schritte. Zunächst wurde das Fragment **31** unter Verwendung des Tosylchlorids mit einer Ausbeute von 62% in das Fragment **42** überführt (Schema 11), welches in einer SUZUKI-MIYAURA-Kreuzkupplung mit weiteren Fragmenten gekuppelt wurde. Zugleich wurde durch die Verwendung des tosylierten Fragments **42** die Möglichkeit der Verbesserung der Reaktionsproduktivität bei der Kupplung von aminfunktionalisierten Substanzen getestet.



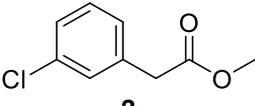
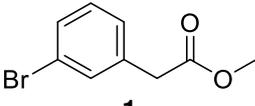
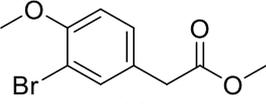
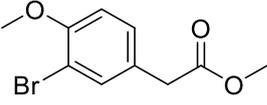
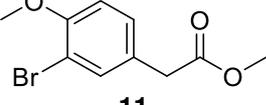
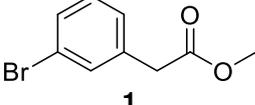
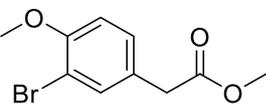
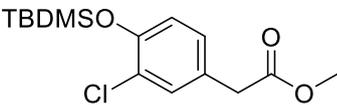
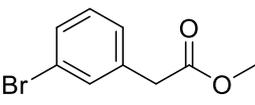
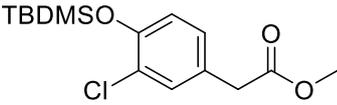
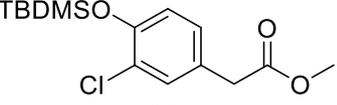
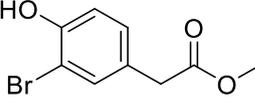
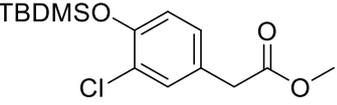
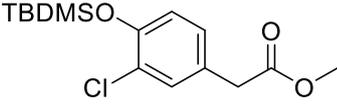
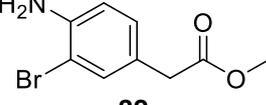
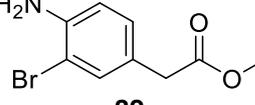
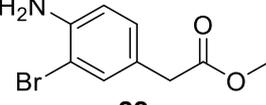
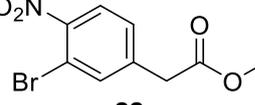
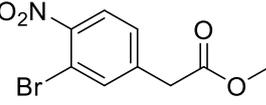
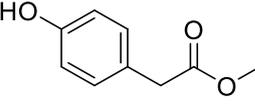
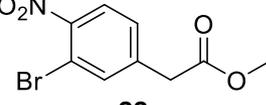
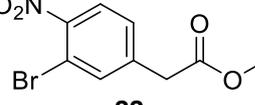
Schema 11: Darstellung des aminotosylierten Fragmentes **42** für die SUZUKI-MIYAURA-Kreuzkupplung.

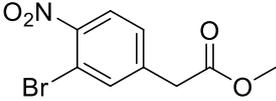
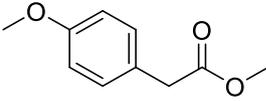
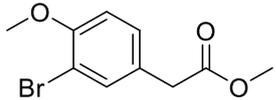
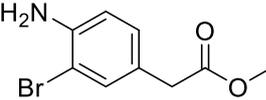
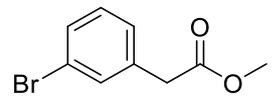
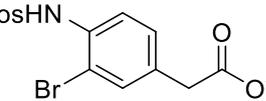
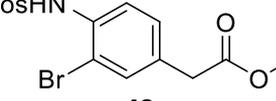
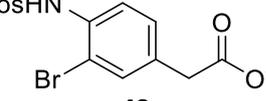
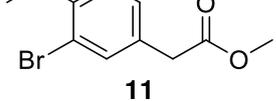
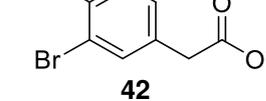
#### 4.1.2.2 Kupplung von erzeugten Fragmenten zum Biarylgrundgerüst

Die finale Sequenz der Darstellungsrouten von den potentiellen Inhibitormolekülen beinhaltete eine SUZUKI-MIYAURA-Kreuzkupplung von den erzeugten Fragmenten, sowie eine darauffolgende Umesterungsreaktion. Dimethylester bzw. Diethylester wurden mittels SUZUKI-MIYAURA-Kreuzkupplung erzeugt, über Reaktionsanalytik identifiziert, und im erhaltenen Zustand in der Umesterungsreaktion zum Benzylester umgesetzt. Die erhaltenen Verbindungen sowie die entsprechenden Ausbeuten sind in der Tabelle 7 zusammengefasst.

Bis auf die nitrofunktionalisierten Verbindungen **36** und **38** wurden die entworfenen Biaryle über den gewählten Weg der *one-pot* SUZUKI-MIYAURA-Kreuzkupplung synthetisiert. Die Produkte der Kupplung wurden entweder als Methylester oder als Ethylester erhalten. Die anschließende Benzylierung, die zum Teil ohne Reinigung des Zwischenproduktes erfolgte, führte zum Erhalten von benzylierten Biarylen mit Ausbeuten von 30% bis 60% (Tabelle 7).

Tabelle 7: Ergebnisse der Darstellung von potentiellen Inhibitoren über die *one-pot* SUZUKI-MIYAUURA-Kreuzkupplung gefolgt von der Umesterungssequenz.

Reaktant I	Reaktant II	SUZUKI-MIYAUURA		Benzylierung N (%)
		Me-Ester N (%)	Et-Ester N (%)	
 <b>3</b>	 <b>1</b>	<b>5 (90)</b>	<b>6 (34)</b>	<b>7 (48)</b>
<b>SUZUKI-MIYAUURA + Umesterung N (% über 4 Stufen)</b>				
<b>7 (23)</b>				
 <b>11</b>	 <b>11</b>	<b>15 (70)</b>	<b>16 (36)</b>	<b>17 (62)</b>
 <b>11</b>	 <b>1</b>	-	<b>18 (23)</b>	<b>19 (50)</b>
 <b>11</b>	 <b>20</b>	<b>SUZUKI-MIYAUURA + Umesterung N (% über 4 Stufen)</b>		
<b>22 (16)*</b>				
 <b>1</b>	 <b>20</b>	<b>SUZUKI-MIYAUURA + Umesterung N (% über 4 Stufen)</b>		
<b>23 (19)*</b>				
 <b>20</b>	 <b>10</b>	-	<b>25 (26)*</b>	<b>26 (83)</b>
 <b>20</b>	 <b>20</b>	<b>SUZUKI-MIYAUURA + Umesterung N (% über 4 Stufen)</b>		
<b>26 (12)*</b>				
 <b>32</b>	 <b>32</b>	<b>SUZUKI-MIYAUURA + Umesterung (% über 4 Stufen)</b>		
<b>34 (14)</b>				
 <b>32</b>	 <b>33</b>	<b>SUZUKI-MIYAUURA + Umesterung N (% über 4 Stufen)</b>		
<b>35 (20)</b>				
 <b>33</b>	 <b>9</b>	<b>Alternative Zugangsroute + Benzy- lierung N (% über 3 Stufen)</b>		
<b>36 (20)</b>				
 <b>33</b>	 <b>33</b>	<b>Alternative Zugangsroute + Benzy- lierung N (% über 3 Stufen)</b>		
<b>38 (8)</b>				

Reaktant I	Reaktant II	SUZUKI-MIYAURA		Benzylierung N (%)
		Me-Ester N (%)	Et-Ester N (%)	
 <b>33</b>	 <b>8</b>	<b>Alternative Zugangsroute + Benzylierung N (% über 3 Stufen)</b>		
				<b>39 (0)</b>
 <b>11</b>	 <b>32</b>	-	<b>40 (16)</b>	-
		<b>SUZUKI-MIYAURA + Umesterung N (% über 4 Stufen)</b>		
				<b>41 (2)</b>
 <b>1</b>	 <b>42</b>	<b>SUZUKI-MIYAURA + Umesterung N (% über 4 Stufen)</b>		
				<b>45 (19)</b>
 <b>42</b>	 <b>42</b>	<b>47 (32)</b>	-	<b>48 (83)</b>
 <b>11</b>	 <b>42</b>	<b>SUZUKI-MIYAURA + Umesterung (% über 4 Stufen)</b>		
				<b>49 (19)</b>

\*OH-Substrat (TBDMS-Ether wird in der Reaktion gespalten)

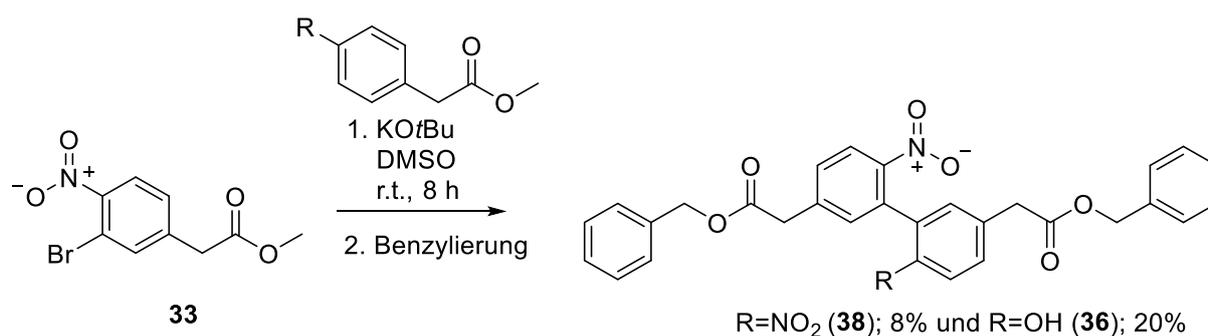
Die Reinigung der Kupplungsprodukte wurde vor allem durch die Bildung von Nebenprodukten aus Dehalogenierungsreaktion und Monokupplung bzw. durch das Zusammenlaufen der Produkte mit Reaktionskomponenten wie XPhos oder Pd-XPhos-GII erschwert. Hierzu zählen die aminofunktionalisierten Endverbindungen **34**, **35** und **40**. Die *one-pot* Variante der Kreuzkupplung wurde für diese Produkte mit dem Benzylierungsschritt zusammengefügt. Aufgrund der Benzylierung wurde das Eluieren der Endverbindungen durch weniger polare Lösungsmittelgemische ermöglicht, weshalb die Trennung von den Nebenprodukten verbessert werden konnte. Die entsprechenden Biaryle konnten in einer guten Reinheit erhalten werden. Die Ausbeuten betragen dabei 5% bis 15% über vier Reaktionsstufen (Tabelle 7).

Die aminotosylierten Endverbindungen **45** und **49** wurden durch den gleichen erweiterten *one-pot* Ansatz in Ausbeuten von 19% über vier Stufen erfolgreich erhalten. Das symmetrisch aminotosylierte Kupplungsprodukt **47** wurde mit einer Ausbeute von 32% als Methylester erhalten, der zum Benzylester **48** mit einer Ausbeute von 83% umgesetzt wurde. Die Ausbeute des tosylierten Produktes **47** war mit 32% dabei höher als die des entsprechenden Produktes **34** mit freien Aminfunktionen

(14%) (Tabelle 7). Das Schützen der freien Amine erhöhte wie bei den freien Hydroxyfunktionen somit die Ausbeute der SUZUKI-MIYAUURA-Kreuzkupplung.

Die Interaktion der freien Hydroxyfunktion mit dem Katalysator bzw. den Intermediaten der Kreuzkupplung konnte erfolgreich unter Verwendung der TBDMS-Schutzgruppe verringert werden. Durch Einsatz des TBDMS-geschützten Chlorphenols **20** als zweiten Reaktanten wurden die benzylierten Endverbindungen **22**, **23** und **26** mit Ausbeuten von 16%, 19% und 12% über vier Reaktionsstufen, sowie das ethylierte Kreuzkupplungsprodukt **25** mit einer Ausbeute von 26% erhalten (Tabelle 7). Der Zugang zum letzteren war unter Verwendung von Halogenphenolen mit der freien Hydroxyfunktion nicht möglich (Tabelle 6 aus dem Abschnitt 4.1.1). Die Stabilität der TBDMS-Gruppe reichte bei den verwendeten basischen Bedingungen nicht aus. Die Schutzgruppe wurde höchstwahrscheinlich im zweiten Schritt der *one-pot* SUZUKI-MIYAUURA-Kreuzkupplung abgespalten, da sowohl das gewünschte Kupplungsprodukt als auch die Produkte der Dehalogenierungsreaktion mit ungeschützten Hydroxyfunktionen erhalten wurden. Eine kontrollierte Abspaltung der Schutzgruppe war unter den basischen Bedingungen der Kupplung nicht möglich. Die Verwendung der unter den basischen Bedingungen stabileren TIPS-Schutzgruppe brachte allerdings keine Verbesserung, da die Reaktion mit dem TIPS-geschützten Derivat **21** zum Erhalten von Edukten und Produkten der Dehalogenierungsreaktion führte.

Die nitrofunktionalisierten Verbindungen **38** und **39** waren über die SUZUKI-MIYAUURA-Kreuzkupplung nicht zugänglich. Nur das Biaryl **35** konnte innerhalb des vierstufigen Synthesansatzes mit einer Ausbeute von 20% erhalten werden (Tabelle 7). Die Substanzen **36** und **38** konnten über eine alternative Reaktion unter Verwendung von KO<sup>t</sup>Bu mit anschließender Benzylierung mit Ausbeuten von 8% und 20% erhalten werden (Schema 12). Die Verbindung **39** konnte weder aus der SUZUKI-MIYAUURA-Kreuzkupplung noch aus dem alternativen Ansatz erhalten werden.



Schema 12: Alternativer Zugang zu den Nitrofunktionalisierten Verbindungen **36** und **38**.

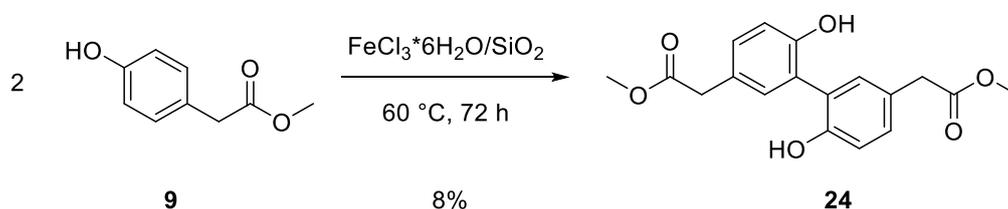
Eine Kupplung von Aminotosylen mit anschließender Entfernung der Tosylfunktion und Oxidation der freien Nitrogruppe unter Verwendung von mCPBS wurde als alternativer Zugang zu den nitrofunktionalisierten Verbindungen getestet. Die Tosylentschützung unter Verwendung von  $\text{Sml}_2$ , Pyrrolidin und Wasser in trockenem THF unter Raumtemperaturbedingungen nach Ankner *et al.*<sup>105</sup>, führte allerdings zur vollständigen Reisolierung der eingesetzten Substanz **45**.

Innerhalb der Synthesen von biarylischen Substanzen wurden mithilfe der hier optimierten *one-pot* SUZUKI-MIYAUURA-Kreuzkupplung und der KO $t$ Bu-basierten Reaktion, mit anschließender Benzylierungsrouten 16 Endverbindungen generiert und chemisch charakterisiert.

### 4.1.3 Biomimetische Synthese von Biaryl-Derivaten

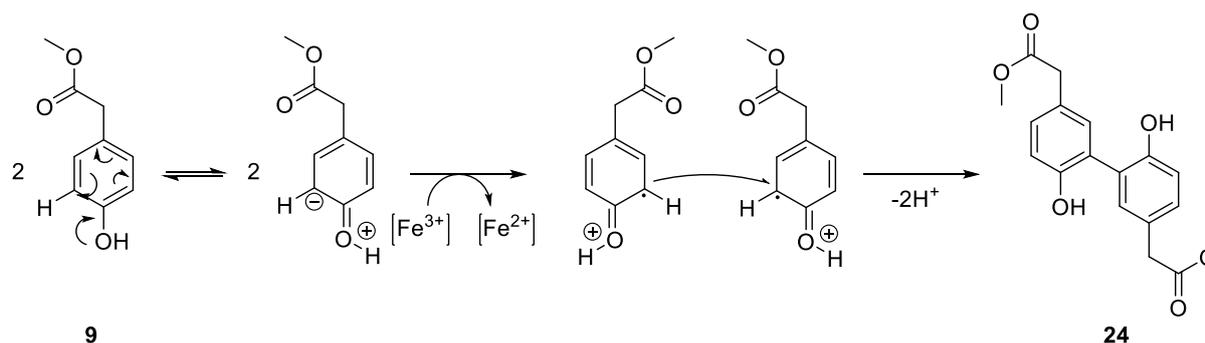
#### 4.1.3.1 Oxidative radikalische $\text{FeCl}_3$ -vermittelte Kupplung von Aromaten

Der erste Schritt des biomimetischen Syntheseweges beinhaltet die oxidative C-C-Bindungsknüpfung zwischen zwei aktivierten Aromaten. Diese wurde durch Eisenchlorid-hexahydrat ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) in einer Festphasenreaktion auf Siliciumdioxid ( $\text{SiO}_2$ ) durchgeführt (Schema 13).



**Schema 13:** Oxidative  $\text{FeCl}_3$ -vermittelte C-C-Bindungsknüpfung zwischen aktivierten Arylen als biomimetischer Zugang zum biarylischen Grundgerüst.

Der Reaktion liegt ein oxidativer radikalischer Mechanismus zugrunde, bei dem Eisen(III)-chlorid mit dem Siliciumdioxid zunächst einen licht- und feuchtigkeitssensitiven Komplex ausbildet. Durch das Eisen(III) in diesem Komplex wird die Radikalbildung in dem delokalisierten aromatischen System initiiert, wodurch die radikalische Bindungsknüpfung zweier Phenole zum Biphenyl ausgelöst wird (Schema 14)<sup>106,107</sup>.



Schema 14: Mechanismus der Fe(III)-vermittelten oxidativen, radikalischen C-C-Bindungsknüpfung.

Die oxidative Kupplungsreaktion wurde mit den Substanzen **8** und **9** durchgeführt. Die entsprechenden Kupplungsprodukte **15** und **24** wurden in Ausbeuten von 2% und 8% erhalten. Bei der Synthese des Phenols **9** wurde die Entstehung vom entsprechenden Ether festgestellt. Die Etherbildung fand dabei sowohl vor als auch nach der Ausbildung der C-C-Bindung unter Ausbildung eines Dibenzofurans statt. Für beide Edukte wurde ebenfalls eine Mehrfachaddition des Eduktes an die entsprechenden Biphenyle beobachtet. Um Ausbeuteminderung durch Nebenproduktbildung zu vermeiden, wurde die Reaktionszeit bis zu 3 h erheblich verkürzt. Der Optimierungsansatz ergab das Produkt allerdings nur in Spuren.

Der Reaktionsansatz wurde für weitere Optimierungen aus der Festphase in das Lösungsmittel Methylenchlorid überführt. Im Kolben wurde hierbei weder in trockenem und entgastem noch im technisch reinen Lösungsmittel Produktbildung beobachtet. Die Reaktionsführung im gleichen Medium bei erhöhten Temperaturen von bis zu 120 °C in der Mikrowellenapparatur ergab hingegen eine Verbesserung der Ausbeute bis 20%. Aufgrund der hohen Überschreitung der Siedetemperatur vom Lösungsmittel wurde der Druckanstieg von 15 bar festgestellt. Die Reaktionszeit wurde dabei von 72 h auf 1 h verkürzt.

#### 4.1.3.2 Enzymatische Monoverseifung des biarylischen Grundgerüsts

Der zweite Schritt des biomimetischen Syntheseweges der Biarylinhibitoren bestand in der Monoverseifung des biarylischen Grundgerüsts an den Esterfunktionen durch die Verwendung der hydrolytischen Aktivität von Lipasen (Schema 3). Das Potential der Esterspaltung durch die Lipasen wurde in einem Initialscreen unter Umsetzung der Dimethyl- und Diethylester **5** und **6** innerhalb von 24 h mit 9 unterschiedlichen kommerziell erworbenen Lipasen (Tabelle 8) in Phosphatpuffer (pH=7.5) und DMSO (1:1) getestet (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Ergebnisse der Lipasen-vermittelten Esterspaltung mit Dimethyl- und Diethylester 5 und 6 (pH=7.5).**

Enzymbezeichnung	t (h)	Y <sub>Me</sub> (%)	Y <sub>Et</sub> (%)	Monoverseifung
<i>Aspergellus niger</i>	24	0	0	-
<i>Rhizopus oryzae</i>	24	32	25	-
<i>Candida antarctica</i> Lipase B	24	11	8	-
<i>Rhizopus niveus</i>	24	35	30	-
<i>Candida rugosa</i>	24	15	15	-
<i>Pig pancreas lipase</i>	24	50	54	-
<i>Mucor michei</i>	24	50	43	-
<i>Pseudomonas cepacia</i>	24	0	0	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	24	20	16	-

Y=Ausbeute (yield); t=Zeit; h=Stunden

Die Umsetzung der Edukte zur freien symmetrischen Säure **51** konnte unabhängig von der Länge der Alkylreste durch die meisten der verwendeten Lipasen bei den ausgewählten Bedingungen beobachtet werden. Nur mit den Lipasen der Pilze *Aspergellus niger* und *Pseudomonas cepacia* wurde keine Umsetzung festgestellt. Das symmetrische Produkt **51** wurde mit einer Ausbeute von 10% bis 50% erhalten. Die Entstehung eines asymmetrischen Produktes wurde nicht festgestellt.

Die Experimente mit der symmetrischen methoxyfunktionalisierten Substanz **15** wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt und führten zunächst ebenfalls zur Entstehung der entsprechenden symmetrischen Säure **52**. Einige der Lipasen wie die des Pilzes *Rhizopus oryzae* und die Schweineleberlipase, die die Biaryle **5** und **6** erfolgreich zur freien Säure **51** umsetzten, zeigten bei der Umsetzung des Biaryls **15** keinen Effekt. Bei der Verwendung der Lipase aus dem Schimmelpilz *Aspergellus niger* konnte mit beiden Substanzen keine Umsetzung beobachtet werden (Tabelle 9 und Tabelle 8).

**Tabelle 9: Ergebnisse der Lipasen-vermittelten Esterspaltung mit Dimethylester 15 (pH=7.5).**

Enzymbezeichnung	t (h)	Y <sub>Me</sub> (%)	Puffer:DMSO	Monoverseifung
<i>Aspergellus niger</i>	24	0	1:1	0
<i>Rhizopus oryzae</i>	24	0	1:1	0
<i>Candida antarctica</i> Lipase B	24	92	1:1	0
<i>Candida rugosa</i>	24	42	1:1	0
<i>Pig pancreas lipase</i>	24	0	1:1	0

Y=Ausbeute (yield); t=Zeit; h=Stunden

Die Lipasen der Pilze *Candida antarctica* und *Candida rugosa* wurden aufgrund der Ausbeuten von 90% und 42% der erhaltenen symmetrischen Säuren **51** und **52** in

weiteren Optimierungstests zum Erhalten des asymmetrischen Produktes verwendet. Hierbei wurden Bedingungen ausgearbeitet, bei denen die Esterhydrolyse nur auf einer der beiden Seiten erfolgt (Tabelle 10).

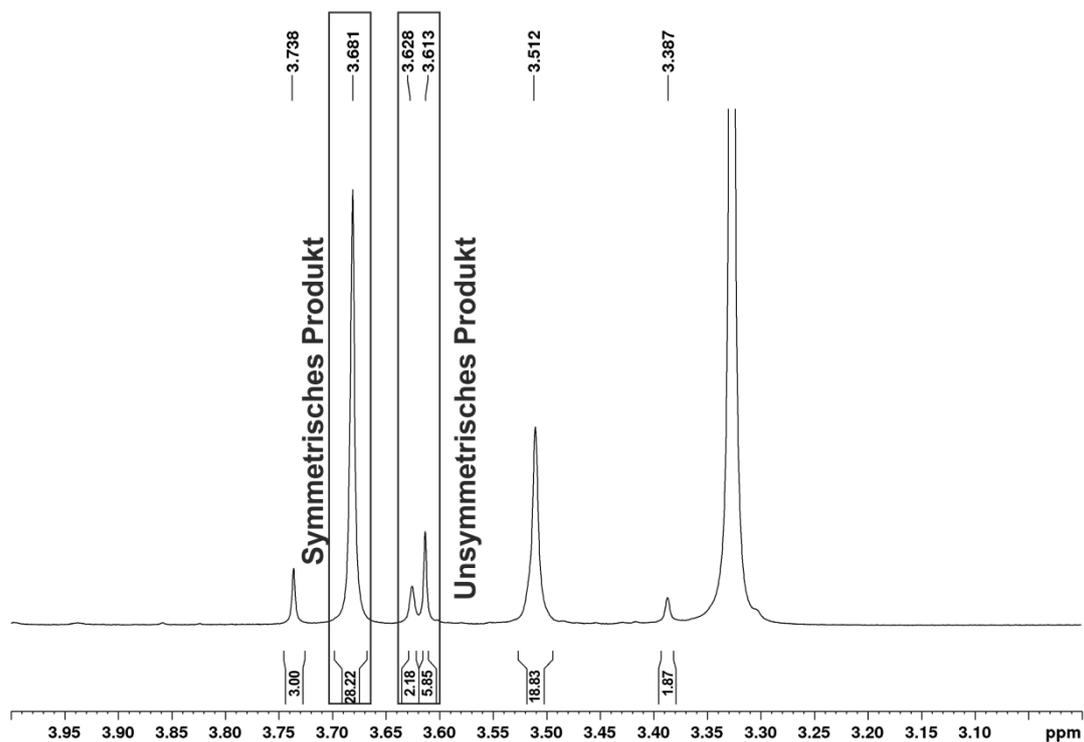
**Tabelle 10: Optimierung der Bedingungen zur Lipasen-vermittelten Monoverseifung der Biaryle.**

Enzymbezeichnung	t (h)	Y <sub>Me</sub> (%)	Puffer:DMSO (pH)	Monoverseifung
<i>Candida antarctica</i> Lipase B	24	92	1:1 (8.0)	0
<i>Candida antarctica</i> Lipase B	2	30	1:1 (8.0)	0
<i>Candida rugosa</i>	24	40	1:1 (8.0)	0
<i>Candida rugosa</i>	2	17	1:1 (8.0)	0
<i>Candida antarctica</i> Lipase B	10	Spuren	10:1 (8.0)	0
<i>Candida rugosa</i>	10	Spuren	10:1 (8.0)	0
<i>Candida antarctica</i> Lipase B	24	25	10:1 (8.0)	5:1*
<i>Candida rugosa</i>	24	20	10:1 (8.0)	5:3*

Y=Ausbeute (*yield*); t=Zeit; h=Stunden; \*Verhältnis der symmetrischen und unsymmetrischen Säure im NMR-Spektrum.

Als erstes wurde die Abhängigkeit der Umsetzung vom pH-Wert der Lösung getestet, indem der pH-Wert des Ansatzes von 7.5 auf 8.0 erhöht wurde. Die symmetrische Säure wurde in beiden Reaktionen in den gleichen Ausbeuten wie bei pH 7.5 erhalten, ohne Bildung des asymmetrischen Produktes **53**. Durch die Verringerung der Umsetzungszeit von 24 h auf 2 h konnte die Monoverseifung ebenfalls nicht herbeigeführt werden. Die Ausbeute wurde in beiden Fällen reduziert (Tabelle 9 und Tabelle 10 erster Teil).

Die Monoverseifung wurde durch die Veränderung der Lösungsmittelzusammensetzung von 1:1 auf 10:1 (Puffer:DMSO) erreicht. Die symmetrischen und asymmetrischen Produkte wurden dabei als Gemisch erhalten (Tabelle 10). Es erfolgte keine Isolierung und entsprechend keine Bestimmung des Enantiomerenüberschusses der erhaltenen Substanzen. Das Verhältnis des symmetrischen und des asymmetrischen Hydrolyseproduktes wurde aus den NMR-Spektren für das aus der Umsetzung mit *Candida Antarctica* Lipase B und *Candida rugosa* erhaltene Produktgemisch jeweils zu 5:1 und 5:3 abgeschätzt (Tabelle 10 und Abbildung 9).



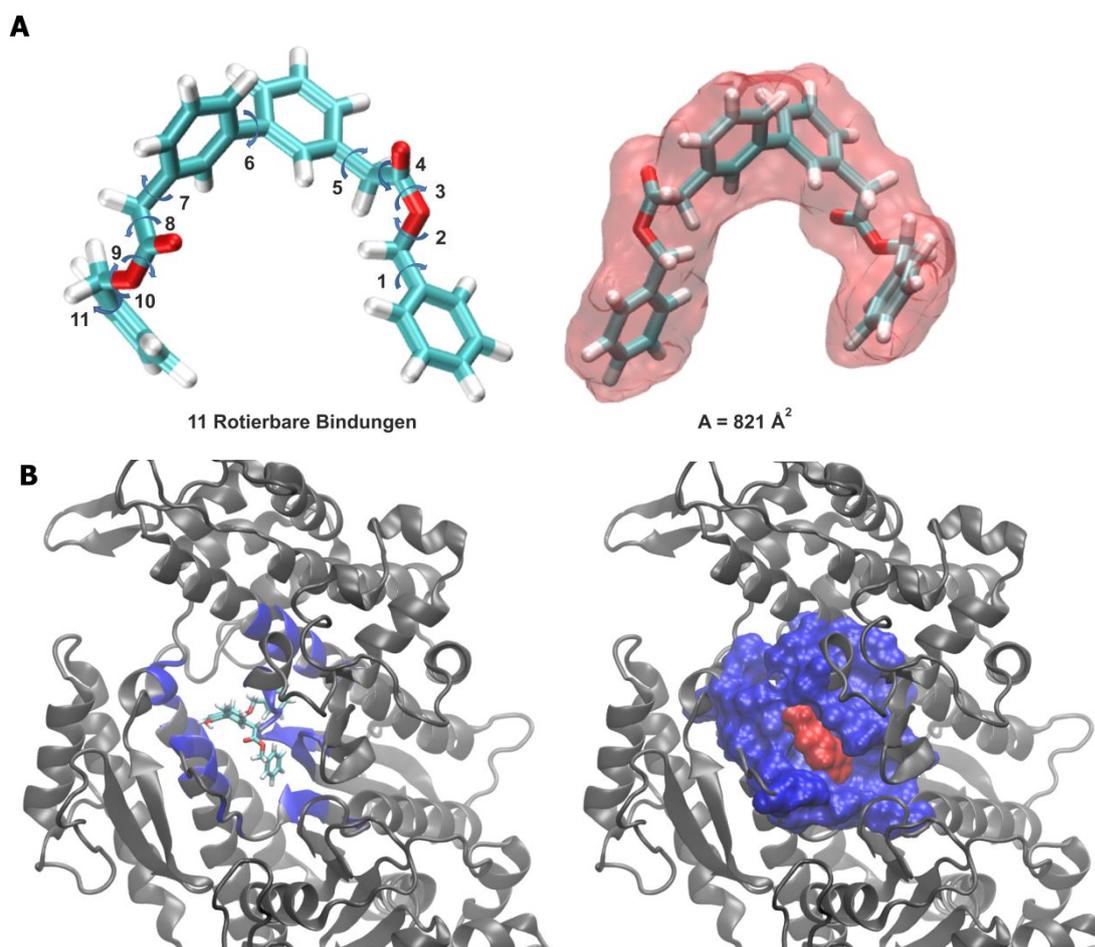
**Abbildung 9: Ausschnitt des NMR-Spektrums vom Produktgemisch aus der enzymatischen Umsetzung des Diacetats 15.**

Die Signale bei 3.74, 3.63, 3.61 und 3.39 ppm gehören zum unsymmetrischen Produkt der enzymatischen Ester-spaltung. Der Anteil des unsymmetrischen Produktes wird anhand des Verhältnisses der beiden Signale der Methoxygruppen bei 3.61 ppm (unsymmetrisches Produkt) und 3.69 ppm (symmetrisches Produkt) ermittelt.

## 4.2 Einfluss der *ortho*-Funktionalisierung auf die inhibitorische Wirksamkeit

### 4.2.1 Funktionalisierung der *ortho*-Position mit MeO- und OH-Gruppen

Die inhibitorische Aktivität der potentiellen biarylischen Inhibitoren gegenüber dem parasitären Myosin A sollte über die *ortho*-Derivatisierung des Grundkörpers verstärkt werden. Das Potential der jeweiligen Veränderung wurde zunächst durch molekulares Docking und die hierbei kalkulierte Gibbs-Energie abgeschätzt. Bei dem verwendeten Proteinmodell und der biarylischen Leitstruktur wurde die Varianz der Inhibitorpositionierung durch die Abmessungen der anvisierten Proteintasche sowie die Anzahl an veränderlichen Freiheitsgraden des Inhibitormoleküls erhöht (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Eigenschaften des Liganden und der allosterischen Tasche des Proteins mit dem Einfluss auf das Clustering der Ergebnisse eines Dockingexperimentes.** **A)** Rotierbare Bindungen im Inhibitor 7, sowie die Oberfläche des Liganden. **B)** Die anvisierte allosterische Tasche im Homologiemodell des parasitären Myosin A mit dem gedockten Liganden (Ligand links in cyan; rechts als Oberflächendarstellung in rot) und den in die Interaktion verwickelten Bereichen der Tasche (links, blau). Die Oberfläche der anvisierten allosterischen Tasche beträgt 1429 Å<sup>2</sup> (Oberfläche rechts in blau). Die Oberflächen des Liganden und der allosterischen Tasche wurde im QwikMD-Tool des VMD-Programms über die Ermittlung der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche (SASA = solvent accessible surface area) jeweils in der Abwesenheit des Proteins und des Inhibitors kalkuliert.

Das einfachste Biaryl **7** mit der geringsten Anzahl an rotierbaren Bindungen weist 11 Bindungen, sowie eine maximale Oberfläche von 821 Å<sup>2</sup> auf (Abbildung 10 A). Die

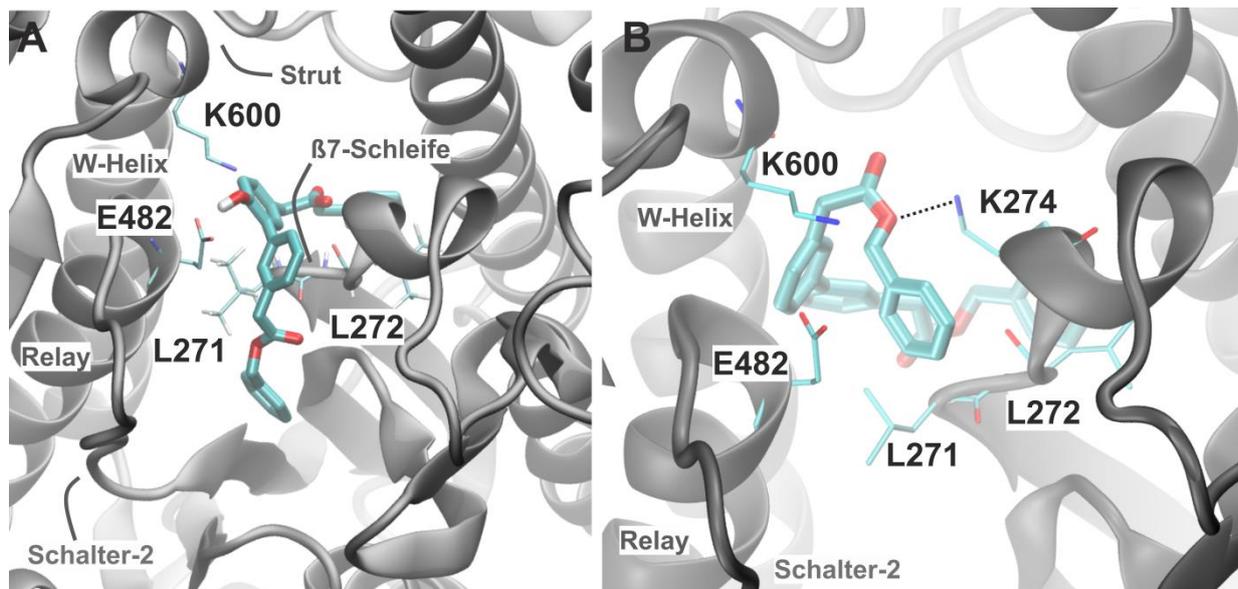
potentielle Kontaktfläche der allosterischen Tasche im Myosin A ist mit der Oberfläche von  $1430 \text{ \AA}^2$  nahezu um das doppelte größer. In den Dockingexperimenten wurde daher eine hohe Anzahl an potentiellen Bindepositionen für die Moleküle erhalten. Die Ergebnisse der Biaryle **7** und **23** werden repräsentativ gezeigt (Tabelle 11 und Abbildung 11). Es wurden jeweils 9 und 12 von 20 möglichen Clustern, die einer Position des Moleküls im Protein entsprechen, erhalten. Die Gibbs-Energien der Protein-Inhibitor-Interaktionen in der jeweiligen höchstpopulierten Position mit 8 ähnlichen Konformationen betragen  $-10.38$  und  $-12.3$  kcal/mol (Tabelle 11 und Abbildung 11).

**Tabelle 11: Dockingergebnisse für Biaryle 23 und 7.**

N (23)	$\Delta G$ (kcal/mol)	NK	N (7)	$\Delta G$ (kcal/mol)	NK
1	-10.75	2	1	-12.53	1
<b>2</b>	<b>-10.38</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>-12.30</b>	<b>3</b>
3	-9.91	1	3	-12.00	1
4	-9.20	1	4	-11.28	2
5	-9.03	1	5	-10.45	1
6	-8.93	1	6	-10.37	1
7	-8.78	3	7	-9.83	4
8	-8.26	2	8	-9.82	2
9	-8.19	1	9	-9.58	2
			10	-9.42	1
			11	-9.00	1
			12	-8.85	1

N=Clusternummer; NK=Anzahl der Konformationen im Cluster

Die am höchsten populierten Positionen der Biaryle **23** und **7** in der allosterischen Tasche des Myosin A weisen interaktionsbedingte Unterschiede auf (Abbildung 11). Die Biarylachse in der Verbindung **23** wurde aufgrund der Interaktionen seitens der Carbonylgruppen der Esterfunktionen mit dem Rückgrat der Leucine 271 und 272 über die  $\beta 7$ -Schleife positioniert und entlang der inneren *Cleft* in Richtung der Nukleotidbindestelle ausgerichtet. Die Hydroxyfunktion in der *ortho*-Position zur Biarylachse bildete Wasserstoffbrückenbindungen mit GLU482 (*Relay*-Helix) und dem LYS600 (*Strut*-Schleife) aus (Abbildung 11 A). In der Abwesenheit des *ortho*-Substituenten im Biaryl **7** wurde eine abweichende Ausrichtung unter Verlust der Interaktionen seitens der Sauerstoffatome der Esterfunktionen mit der  $\beta 7$ -Schleife festgestellt. Hier wurde das Grundgerüst in dem hydrophoben Bereich an der W-Helix lokalisiert (Abbildung 11 B).



**Abbildung 11: Positionen der Biaryle 23 und 7 in der allosterischen Tasche des Myosin A mit den entsprechenden Interaktionen ermittelt über molekulares Docking. A) Polare Interaktionen mit LYS600 (Strut-Schleife), GLU482 (Relay-Helix), LEU272 und LEU271 (beide  $\beta$ 7-Schleife). B) Der biarylische Grundkörper wurde zur W-Helix verschoben. Polare Interaktion mit LYS274. Aminosäuren sind mit Einbuchstabencode angegeben.**

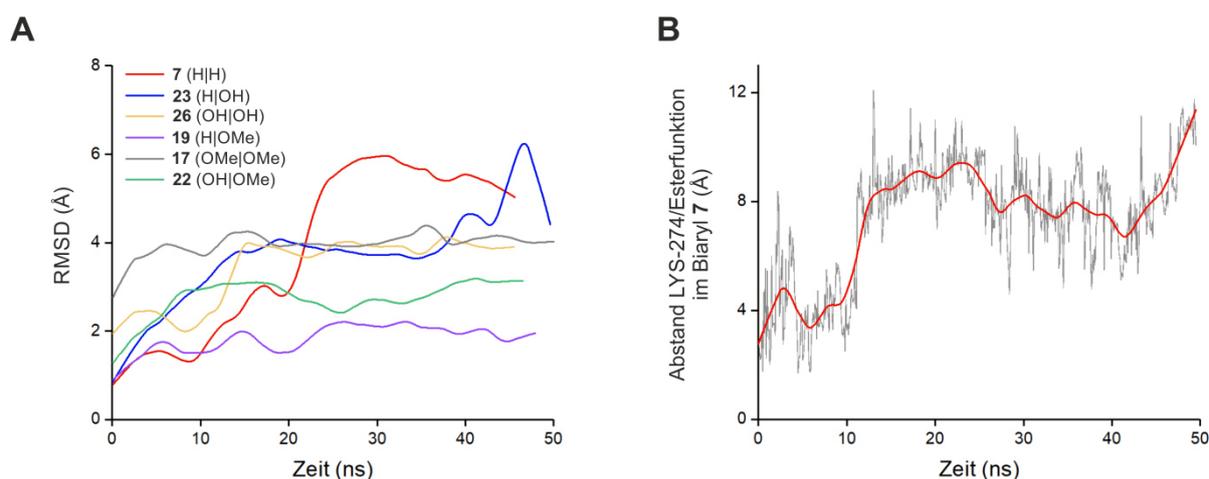
Die kalkulierte Gibbs-Energie des Protein-Biaryl-Komplexes war in dieser Position mit dem Wert  $-12.48$  kcal/mol die günstigste von zwei gefundenen Positionen (Tabelle 12). Die Positionierung des Biaryls **7** ermöglichte zusätzlich eine Wechselwirkung mit dem LYS274, die für die Position des Biaryls **23** nicht ermittelt wurde. Das in den Myosinen konservierte Lysin bildet mit ASP603 und GLN644 einen Interaktionscluster, der Behrens *et al.* zufolge den Aktin-Bindebereich des Proteins modulieren und den Bindeprozess mitsteuern soll<sup>51</sup>. Die allosterischen Kommunikationen der Binde-region von Aktin mit der Nukleotidbindestelle kann durch die Störung des Interaktionsclusters ebenfalls gestört werden<sup>50,51</sup>. Die *ortho*-Positionen des Grundgerüsts wurden daher in den Biarylen **17**, **19**, **22** und **26** mit Hydroxy- und Methoxygruppen auf symmetrische und asymmetrische Weise funktionalisiert. Durch die Funktionalisierung sollte die Anzahl von Protein-Biaryl-Interaktionen erhöht werden, wodurch die Wechselwirkung mit dem LYS274 zusätzlich verstärkt werden könnte (Tabelle 12). Die Biaryl-Derivate **17**, **19**, **22** und **26** wiesen beim molekularen Docking mit der Position des Biaryls **23** vergleichbare Positionen sowie Interaktionen auf. Die Gibbs-Energie wurde dabei im Vergleich zum Biaryl **23** von  $-10$  kcal/mol bis  $-12$  kcal/mol verbessert (Tabelle 12).

Zur Verifizierung der Interaktionsstabilität der beiden gefundenen Positionierungen unter Berücksichtigung der Proteindynamik und der potentiellen Lösungsmittelleffekte wurden mit den erhaltenen Protein-Biaryl-Komplexen MD-Simulationen durchgeführt.

Zusätzlich lieferten die Simulationen eine Verifizierung der Gibbs-Energie über die Methode der Linearen Interaktionsenergie (LIE)<sup>103,108</sup>. Die Gibbs-Energie des Komplexes mit Biaryl **7** betrug -0.29 kcal/mol nach der LIE-Methode und der RMSD-Verlauf, der die Stabilität der Moleküllage widerspiegelt, zeigte eine Abweichung von der Initiallage von 6 Å (Tabelle 12 und Abbildung 12 A). Die Interaktion mit dem LYS274 war ebenfalls destabilisiert (Abbildung 12 B).

**Tabelle 12: *In silico*-Ergebnisse der MeO-/OH-Funktionalisierung des biarylischen Grundgerüsts.**

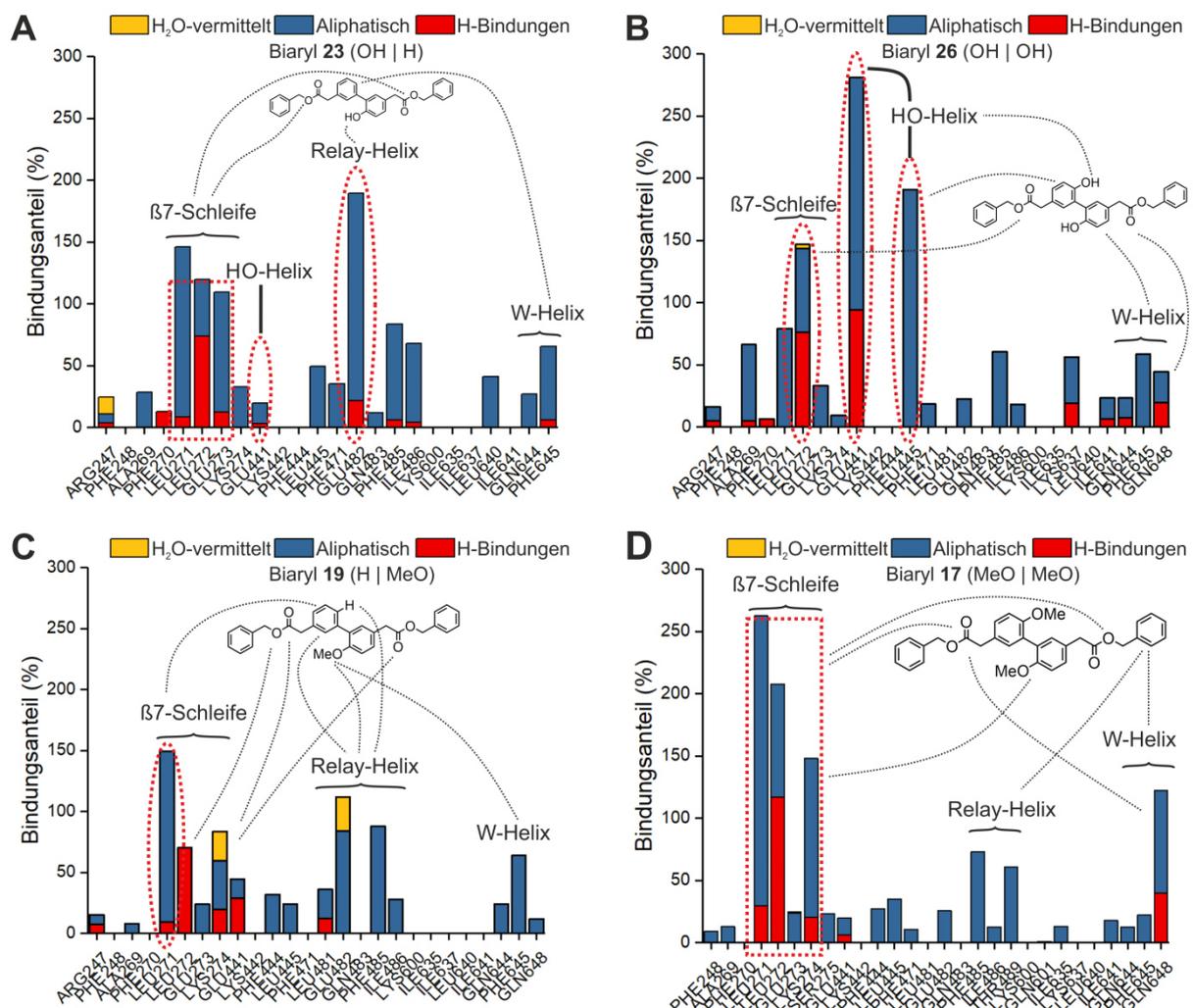
Inhibitor	Funktionalisierung	$\Delta G_{\text{Docking}}$ (kcal/mol)	$\Delta G_{\text{LIE}}$ (kcal/mol)
<b>7</b>	H   H	-12.48	-0.29
<b>23</b>	H   OH	-10.13	-4.17
<b>26</b>	OH   OH	-11.40	-8.02
<b>22</b>	OH   OMe	-11.29	-8.28
<b>17</b>	OMe   OMe	-10.77	-10.90
<b>19</b>	H   OMe	-11.96	-11.62



**Abbildung 12: *In silico* Initialexperimente zur Ermittlung des Funktionalisierungspotentials der Biaryle.** **A)** RMSD-Zeit-Diagramm für die MeO/OH-funktionalisierten Biaryl-inhibitoren: **7** (rot), **23** (blau), **26** (gelb), **19** (grün), **17** (violett) und **22** (grau). Das Diagramm stellt die zeitliche Änderung der Inhibitorposition innerhalb der klassischen MD-Simulation dar. **B)** Das Abstand-Zeit-Diagramm stellt die Interaktion der Esterfunktion des Biaryls **7** mit dem LYS274 dar.

Die Position des Biaryls **23** und des symmetrischen Derivates **26** stellte dagegen sowohl im RMSD-Verlauf als auch energetisch eine günstigere Lage dar (Tabelle 12, Abbildung 12 A). Die symmetrische Funktionalisierung im Biaryl **26** erhöhte den polaren und aliphatischen Bindungsanteil jeweils zwischen der OH-Gruppe und GLU441 (HO-Helix) sowie dem aromatischen Grundgerüst und LEU445 (Abbildung 13 A und B). Der biarylische Grundkörper wurde daher verglichen zum asymmetrischen Biaryl **23** von der *Relay*-Helix in Richtung der HO-Helix verschoben. Die Interaktionsenergie wurde dabei verdoppelt (jeweils -4.17 und -8.02 kcal/mol). Durch die Funktionalisie-

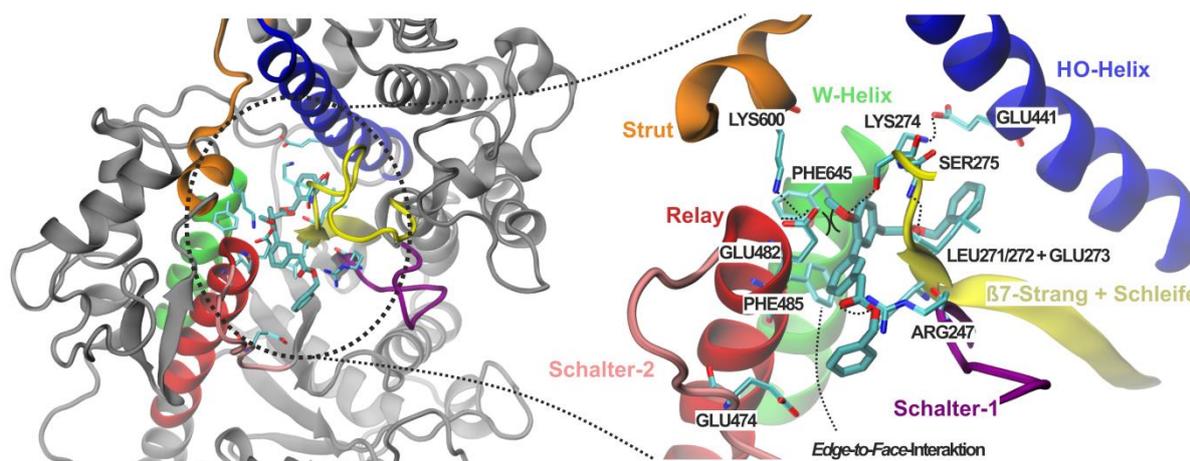
rung der *ortho*-Positionen mit MeO-Gruppe (Biaryle **19**, **17** und **22**) konnte die Lage des Moleküls über der  $\beta$ 7-Schleife stabilisiert werden (Abbildung 12 A). Die Gibbs-Energie der Protein-Biaryl-Interaktion wurde bis zu einem Wert von -11.96 (Biaryl **19**) herabgesetzt. In der Simulation mit Biaryl **17** wurde der Kontakt zur  $\beta$ 7-Schleife durch die aliphatische Interaktion zwischen LYS274 und der Methoxygruppe verstärkt, wogegen im Falle des Biaryls **19** eine wasservermittelte Bindung den polaren Bindungsanteil erhöhte (Abbildung 13 C und D).



**Abbildung 13: Quantifizierung von Interaktionen seitens MeO- und OH-funktionalisierten Biarylen innerhalb der allosterischen Tasche des Myosin A.** In den Diagrammen wird der Bindungsanteil für die Biaryle **23** (A), **26** (B), **19** (C) und **17** (D) an der gesamten Länge der MD-Simulation von 50 ns angegeben. Die Werte über 100% bedeuten, dass die Aminosäure entweder in unterschiedliche Arten der Interaktion verwickelt wurde oder mit mehreren Funktionen des Biaryls interagiert. Die Bindungsarten sind wie folgt gezeigt: gelb - Wasser-vermittelte; blau - Hydrophobe; rot - Wasserstoffbrückenbindungen. Die Hauptinteraktionsbereiche sind durch rote gestrichelte Linie mit entsprechender Benennung des Sekundärstrukturelementes hervorgehoben. Die interagierenden Funktionen des jeweiligen Biaryls sind durch gestrichelte Verbindungslinien dargestellt.

In beiden Fällen wurde eine Intensivierung der Interaktion mit den W- und Relay-Helices festgestellt. In der Simulation mit Biaryl **17** resultierte diese aus den Wechselwirkungen des aromatischen Benzyls mit GLN648 und PHE485. Beim Biaryl **19**

wurde die Interaktion durch den *Edge-to-Face*-Kontakt des aromatischen Grundgerüsts mit der Seitenkette des PHE485 und C-H- $\pi$ -Interaktion zwischen einer MeO-Gruppe und PHE645 ermöglicht (Abbildung 14, Abbildung 13 C und D). Durch die Methoxyfunktion wurde zusätzlich die polare Abstoßung der Sauerstoffatome des GLU482 (*Relay*-Helix) und des Methoxysauerstoffs verringert. Das kann zur Stabilisierung der Interaktionen zwischen LYS600 und GLU482 sowie zwischen Methoxyfunktion und der Hydroxyfunktion des SER-275 beigetragen haben (Abbildung 14). Zusätzlich bestand zwischen GLU482 und der Methoxygruppe des Biaryls **19** eine indirekte, wasservermittelte Interaktion, die die Stabilität der Lage erhöhte. Die Anzahl der Protein-Biaryl-Interaktionen, sowie der höhere Anteil an günstigen intramolekularen Bindungen in der allosterischen Tasche des Myosin A führten zur Ermittlung des günstigsten  $\Delta G$ -Wertes von -11.62 kcal/mol für die Lage des Biaryls **19** in der allosterischen Tasche des Myosin A (Tabelle 12 und Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Die Lage des Biaryls **19** in der allosterischen Tasche des Myosin A und die potentiellen Aminosäuren, die durch die *ortho*-Funktionalisierung der Biaryle zur Verstärkung der Protein-Biaryl-Interaktion anvisiert wurden. Die Sekundärstrukturelemente der Protein-Cleft, die in die Interaktion mit dem biarylischen Inhibitor involviert sein können und die dazugehörigen interagierenden Aminosäuren. Die Sekundärstrukturelemente *Relay*-Helix (rot), *HO*-Helix (blau), *W*-Helix (grün), Schalter-1 (violett) und 2 (magenta),  $\beta$ 7-Strang und  $\beta$ 7-Schleife (gelb) sind potentielle Aminosäuren (Dreibuchstabencode und Stäbchendarstellung cyan), die durch polare Interaktionen die Lage des Biaryls in der allosterischen Tasche verfestigen können.

Die *in silico* erzeugten Daten wurden *in vitro* über die ATPase- und MST-Experimente unter Verwendung vom Proteinmodell des Myosin A validiert. In den Experimenten wurden die  $IC_{50}$ - und  $K_D$ -Werte des jeweiligen Inhibitorderivates aus der Serie der methoxy- und hydroxyfunktionalisierten Moleküle **23**, **26**, **22**, **17** und **19** geprüft. Die Substanzen zeigten einen Effekt auf die ATPase-Aktivität des Myosin A-Modells. Die  $IC_{50}$ - und  $K_D$ -Werte lagen im niedrigen mikromolaren Konzentrationsbereich und folgten dem gleichen Trend, der bei den Energiebestimmungen über die

LIE-Methode beobachtet wurde (Abbildung 15 und Tabelle 13). Das höchste Interaktionspotential der symmetrisch und asymmetrisch methoxyfunktionalisierten Biaryl-derivate **17** und **19** wurde sowohl anhand der Aktivität- als auch der Affinitätsbestimmung bestätigt (Abbildung 15).

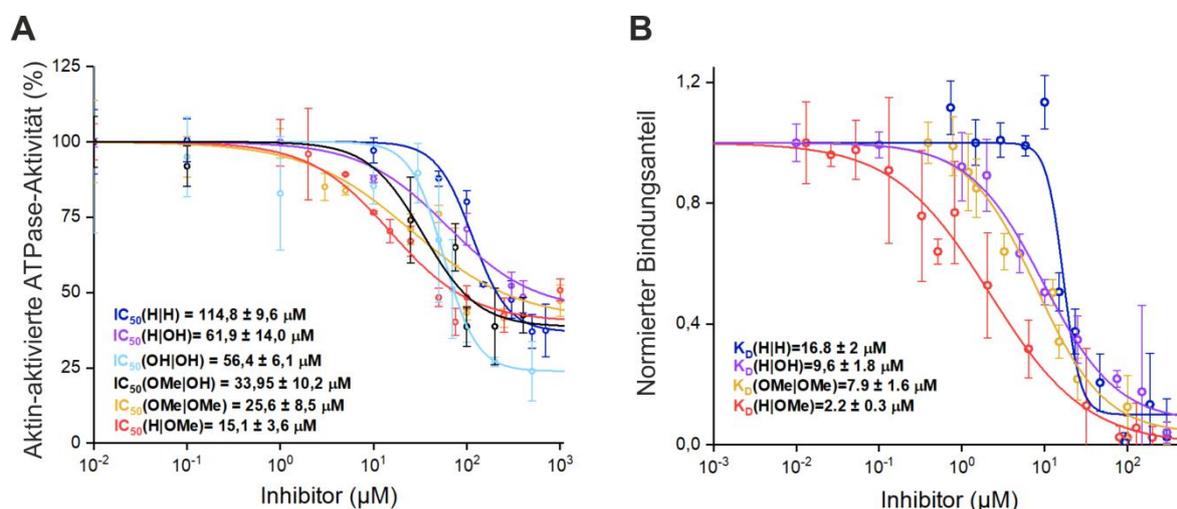


Abbildung 15: Bestimmung der  $IC_{50}$ - und  $K_D$ -Werte zur Korrelationsprüfung der *in silico* Experimente für die Initialverbindungen mit Methoxy- und Hydroxyfunktionen.

Tabelle 13: Korrelation der *in silico* Ergebnisse mit der *in vitro* Quantifizierung über  $IC_{50}$ - und  $K_D$ -Werte.

N(Funktionalisierung)	$\Delta G_{\text{Docking}}$ (kcal/mol)	$\Delta G_{\text{LIE}}$ (kcal/mol)	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_D$ ( $\mu\text{M}$ )
<b>7</b> (H H)	-12.48	-0.29	114.8±9.6	16.8±2
<b>23</b> (H OH)	-10.13	-4,17	61.9±14	9.6±1.8
<b>26</b> (OH OH)	-11.40	-8.02	56.4±6.1	-
<b>22</b> (OH OMe)	-11.29	-8.28	33.9±10	-
<b>17</b> (OMe OMe)	-10.77	-10.90	25.6±8.5	1.9±0.5
<b>19</b> (H OMe)	-11.96	-11.62	15.1±3.6	1.3±0.3

Die Ausrichtung der Inhibitormoleküle **23**, **22**, **17** und **19** innerhalb der Protein-*Cleft* begünstigt die Nähe von Sekundärstrukturelementen der *Relay*- und *W*-Helices, *Strut*-Schleife und Schalter-1 zur *ortho*-Position der biarylischen Leitstruktur (Abbildung 14). Durch die asymmetrische Methoxyfunktionalisierung der *ortho*-Position wurde die Positionierung des biarylischen Grundgerüsts über der  $\beta 7$ -Schleife (LEU271/272) durch die Zunahme an Wechselwirkungen mit den *Relay*- und *W*-Helices (PHE485, GLU482 und PHE645, GLN648 entsprechend), sowie der Aminosäure der  $\beta 7$ -Schleife LYS274 verstärkt. Bei der weiteren Derivatisierung wurde die Myosin A-Biaryl-Interaktion durch eine höhere Bindungszahl und durch die Einbeziehung der Aminosäuren von *Strut*-Schleife und Schalter-1 verstärkt.

#### 4.2.2 Einfluss der Polarität und Sterik der *ortho*-Funktionalisierung

Die weitere Derivatisierung des biarylischen Grundgerüsts erfolgte mit dem Ziel, durch die Erhöhung der Interaktionszahl sowie die Einbeziehung von Sekundärstrukturelementen *Relay*-Helix, Strut-Schleife und Schalter-1 die Myosin A-Biaryl-Interaktion zu verstärken. Zu diesem Zweck wurde das biarylische Grundgerüst außer Hydroxy- und Methoxyfunktionen mit polaren Amino- und Nitrogruppen, sowie sterisch überfrachteten Benzyloxy-, Tosylamino- und *N*-Benzyl-*N*-Tosylaminogruppen in den *ortho*-Positionen symmetrisch und asymmetrisch funktionalisiert. Hierbei wurden die Derivate mit ungünstigen Energiewerten der LIE-Kalkulation aussortiert und bei der Synthese der Derivate nicht berücksichtigt (Tabelle 14).

**Tabelle 14: *In silico* Ergebnisse der Derivatisierung des biarylischen Grundgerüsts.**

N	Funktionalisierung	$\Delta G_{\text{Docking}}$ (kcal/mol)	$\Delta G_{\text{LIE}}$ (kcal/mol)	Synthese
46	H   NH <sub>2</sub>	-10.76	-0.56	--
34	NH <sub>2</sub>   NH <sub>2</sub>	-10.49	-4.53	v
69	NH <sub>2</sub>   OH	-11.60	-4.27	v
41	NH <sub>2</sub>   OMe	-10.63	-6.77	v
68	H   NO <sub>2</sub>	-13.26	-10.09	v
38	NO <sub>2</sub>   NO <sub>2</sub>	-11.86	-19.16	v
35	NO <sub>2</sub>   NH <sub>2</sub>	-13.22	-14.03	v
36	NO <sub>2</sub>   OH	-13.96	-13.96	v
39	NO <sub>2</sub>   OMe	-12.43	-16.29	v
27	OMe   OBn	-11.78	-13.75	v
48	TosNH   TosNH	-12.54	-	v
47	TosNH   TosNH Me-Ester	-8.45	-	v
67	BnNH   BnNH	-7.26	-	--
45	H   TosNH	-12.69	-	v
50	TosNBn   TosNBn	-14.62	-	v

v = Verbindung wurde bei den Synthesen berücksichtigt; -- = Verbindung wurde bei den Synthesen nicht berücksichtigt.

Die Einsicht in die einzelnen energetischen Beiträge der elektrostatischen Energie und der Van-der-Waals-Energie innerhalb der Berechnung der Gibbs-Energie nach der LIE-Methode ergab zwei weitere Erkenntnisse. Der Van-der-Waals-Energiebeitrag, der bei den durchgeführten *in silico* Kalkulationen überwiegend aus den hydrophoben Wechselwirkungen resultiert, war für alle Substanzen mit dem biarylischen Grundgerüst höher als der energetische Beitrag der elektrostatischen Wechselwirkungen. Die Erhöhung der Myosin A-Biaryl-Wechselwirkung aufgrund der Veränderungen des biarylischen Grundgerüsts war auf die Zunahme sowohl der

elektrostatischen als auch der Van-der-Waals-Interaktionen zurückzuführen (Diagramm 1). Bei dem benzyloxy- und methoxyfunktionalisierten Biaryl **27** ist der Van-der-Waals-Beitrag aufgrund der unpolaren funktionellen Gruppen am höchsten. Bei den Biarylen **7**, **23**, **69** und **34**, ist der polare Anteil der Interaktionsenergie trotz der Variation der Hydroxy- und Aminfunktionen nahezu gleich, während der Van-der-Waals-Energiebetrag in dieser Reihe günstiger wird (-90 kcal/mol auf -100 kcal/mol). In MD-Simulation mit dem NH<sub>2</sub>-funktionalisierten Biaryl **46** wurde ein erhöhter Solvationseffekt festgestellt, wodurch die potentiellen elektrostatischen Wechselwirkungen zu Aminosäuren des Myosin A abgeschirmt wurden. Dieser Effekt verursacht höchstwahrscheinlich den Anstieg des polaren Energiebeitrages. In der Anwesenheit der hydrophoben Methoxyfunktion im Biaryl **41** wurden die polaren Interaktionen bei einem nahezu gleichen Van-der-Waals-Anteil günstiger (Diagramm 1). Im symmetrisch hydroxyfunktionalisierten Biaryl **26** wurde die Van-der-Waals-Interaktionsenergie ungünstig (Anstieg bis -90 kcal/mol).

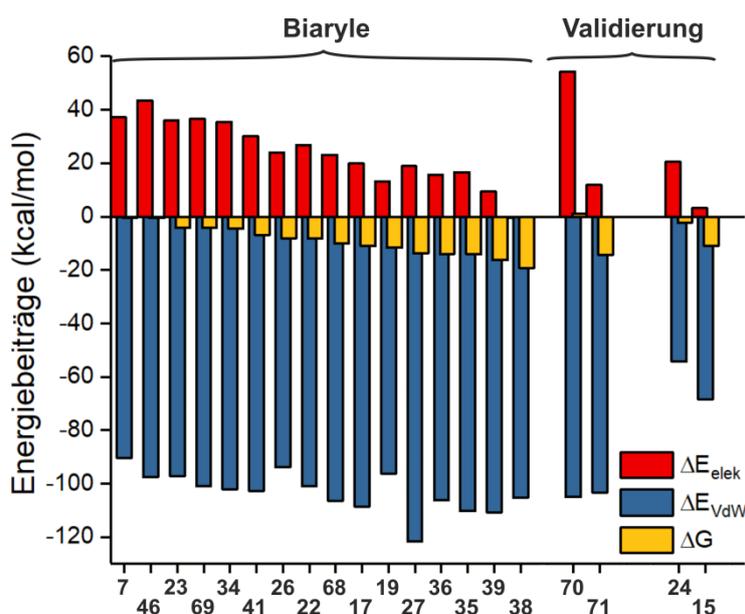


Diagramm 1: Energiediagramm der Berechnung von  $\Delta G$ -Werten der Protein-Biaryl-Komplexe nach der LIE-Methode aus den Beiträgen der elektrostatischen Energie und der Energie der Van-der-Waals-Wechselwirkungen.

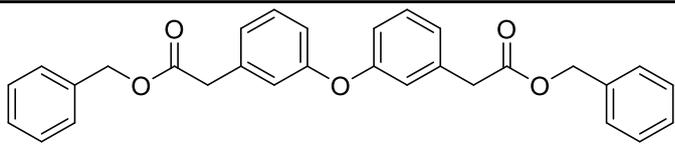
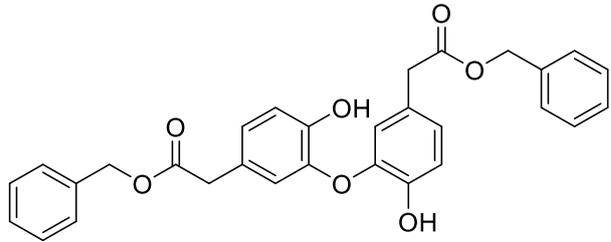
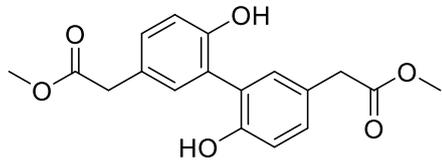
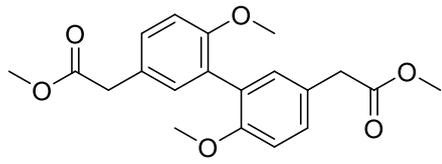
Der Anstieg resultierte aus der Interaktion der Hydroxyfunktionen mit dem GLU441 der W-Helix und damit verbundener Abweichung der Moleküllage von dem Bereich über der  $\beta 7$ -Schleife (Abbildung 13 B). Die Kombination der Hydroxy- mit Methoxyfunktion im Biaryl **22** verbessert die Van-der-Waals-Interaktion durch die Positionierung des Moleküls über der  $\beta 7$ -Schleife, verursacht allerdings einen Anstieg des elektrostatischen Energieanteils bis 25 kcal/mol. Dieser wird in den Simulationen mit den Biarylen **68** und **17** bis 20 kcal/mol verringert. Der Betrag der

Van-der-Waals-Wechselwirkungsenergie beim Biaryl **19** gleicht dem des Biaryls **26**. Die Positionierung des Moleküls über der  $\beta$ 7-Schleife sowie die durch die Methoxygruppe begünstigte Interaktionen führen allerdings zur Abnahme des elektrostatischen Beitrages und einer günstigeren Gibbs-Energie (-8.02 und -11.62 kcal/mol entsprechend). Sehr günstige elektrostatische Interaktionen wurden mit den polaren  $\text{NO}_2$ -Gruppen in den Biarylen **36**, **35**, **39** und **38** erreicht (Diagramm 1). Hier wurde der polare Energiebeitrag mit Biaryl **38** bis zu einem Wert von -0.58 kcal/mol verringert und die günstigste Gibbs-Energie von -19.2 kcal/mol erreicht.

Zur Überprüfung des Potentials von größeren Modifikationen des biarylischen Grundgerüsts und der Rolle der benzyliischen Esterfunktionen wurden jeweils zwei zusätzliche Veränderungen vorgenommen (Tabelle 15). Das biarylische Grundgerüst wurde durch den Oxybisphenyl, sowie die benzyliischen Esterfunktionen durch die Methylgruppen ersetzt. Das Ersetzen des biarylischen Grundgerüsts durch die oxybisphenylische Grundstruktur im potentiellen Inhibitor **70** erhöht im Vergleich zum entsprechenden Biaryl **7** den Van-der-Waals-Energiebeitrag (Diagramm 1). Zugleich steigt der elektrostatische Energiebeitrag, wodurch die Gibbs-Energie des Protein-Inhibitor-Komplexes ungünstig wird (Diagramm 1). Eine zusätzliche Funktionalisierung des Oxybisphenyls in den *ortho*-Positionen der Etherbrücke (Inhibitor **71**) verbessert das elektrostatische Potential des Grundgerüsts und die Gibbs-Energie erreicht einen Wert von -14.2 kcal/mol (Tabelle 15). Eine vergleichbare Steigerung wurde bei dem Biarylischen Grundgerüst nicht beobachtet.

Die Rolle der Esterfunktionen am biarylischen Grundgerüst wird durch ihren Austausch der Methylfunktionen verdeutlicht. Der Energiebeitrag der Van-der-Waals-Wechselwirkungen wird durch diesen Austausch nahezu halbiert (Biaryle **24** und **15** gegen entsprechende Biaryle **26** und **17**, Tabelle 15, Diagramm 1). Der Beitrag der elektrostatischen Energie wird zugleich verringert. Der Einfluss des elektrostatischen Beitrages auf die resultierende Gibbs-Energie des Komplexes ist allerdings geringer als der, der aus dem Beitrag der unpolaren Wechselwirkungen resultiert (Diagramm 1).

Tabelle 15: Übersicht der Grundgerüstveränderungen.

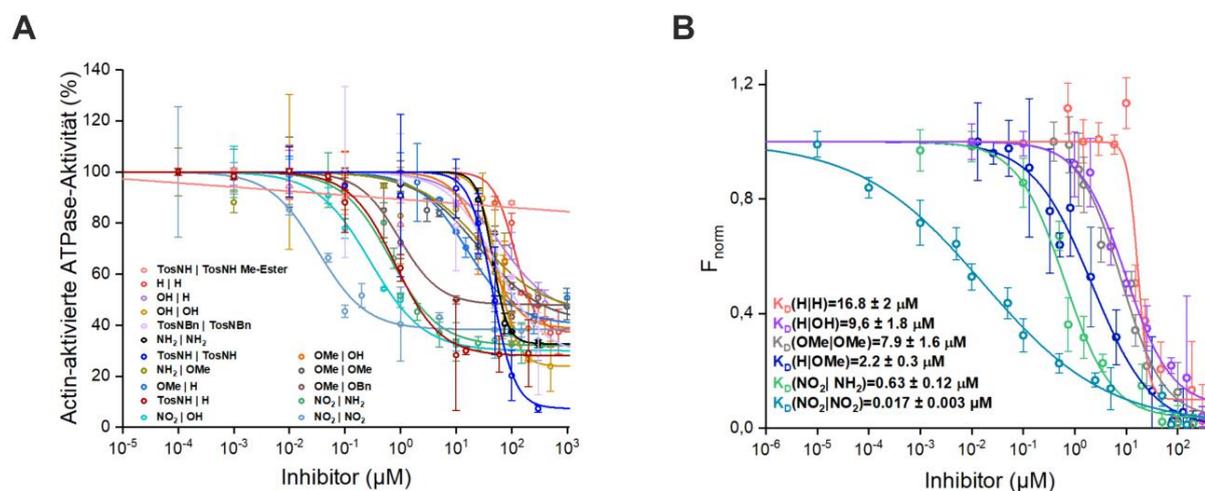
Grundkörper	$\Delta G_{LIE}$ (kcal/mol)
 <p style="text-align: center;"><b>70</b></p>	1.19
 <p style="text-align: center;"><b>71</b></p>	-14.2
 <p style="text-align: center;"><b>24</b></p>	-2.19
 <p style="text-align: center;"><b>15</b></p>	-10.9

### 4.3 Studien der Struktur-Aktivitätsbeziehung (SAR)

#### 4.3.1 *In vitro* Experimente zur Aktivitäts- und Affinitätsbestimmung

Die synthetisierten Biaryle wurden an einem Modell für das parasitäre Myosin A auf deren Effekt auf die ATPase-Aktivität des Proteins *in vitro* getestet. Der Effekt wurde anhand von  $IC_{50}$ -Werten quantifiziert. Zur Validierung der ermittelten  $IC_{50}$ -Werte wurden MST-Experimente durchgeführt, in denen Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) einiger Protein-Biaryl-Komplexe ermittelt wurden. Die Ergebnisse der Experimente sind in Tabelle 16 und Abbildung 16 zusammengefasst. Die Aktin-aktivierte ATPase-Aktivität des Myosin A-Modells wurde mit Ausnahme des Biaryls **47** durch alle getesteten Biaryle signifikant herabgesetzt. Die  $IC_{50}$ -Werte der aktivsten Verbindungen lagen im unteren nanomolaren Bereich (Tabelle 16). Für die meisten Verbindungen wurde ab den Konzentrationen von 100  $\mu$ M aufgrund der Löslichkeitseigenschaften das untere Plateau nicht erreicht. Die Restaktivität des Myosin A-Modells betrug hierbei etwa 30% der Aktin-aktivierten Aktivität. Die Tosylierung der Aminfunktionen

des Biaryls **34** führte zu einer signifikanten Verbesserung der Löslichkeit, wodurch die Aktivität der Trippelmutante durch höhere Konzentrationen des Inhibitors **48** bis zum Wert von 10% herabgesetzt wurde (Abbildung 16).



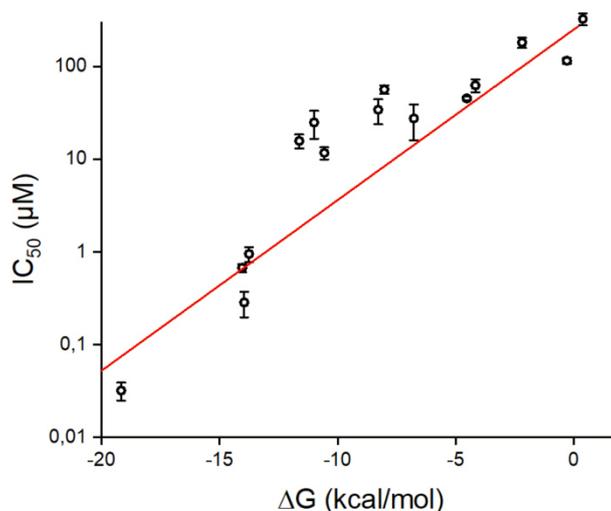
**Abbildung 16: Bestimmung der  $IC_{50}$ - und  $K_D$ -Werte zur Ermittlung der inhibitorischen Aktivität der Biaryl-Derivate gegenüber dem Myosin A-Modell.**

Das symmetrische  $NH_2$ -funktionalisierte Biaryl **34** verringerte mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $45 \mu M$  die ATPase-Aktivität des Motorproteins mit einem höheren Effekt als das entsprechende hydroxyfunktionalisierte Derivat **26** ( $IC_{50}=56 \mu M$ ), sowie das asymmetrische Derivat **23** ( $IC_{50}=62 \mu M$ ). Die sterisch überfrachteten Substrate **48** und **50** mit den zusätzlichen Funktionalisierungen der Aminogruppen durch Tosyl-, sowie die Benzyl- und Tosylfunktionen zugleich, zeigten einen ähnlichen Effekt. Die  $IC_{50}$ -Werte lagen jeweils bei  $45 \mu M$  und  $52 \mu M$ . Eine zusätzliche Methoxy-Substitution in der *ortho*-Position am benachbarten Benzolring der amin- und hydroxyfunktionalisierten Biaryle **22** und **41** brachte jeweils eine Halbierung des  $IC_{50}$ -Wertes ( $60 \mu M$  auf  $30 \mu M$ ), während die Werte der inhibitorischen Konzentration der symmetrischen und asymmetrischen Derivate **17** und **19** jeweils  $25 \mu M$  und  $15 \mu M$  betragen. Somit ist der Effekt des Biaryls **19** auf die ATPase-Aktivität des Myosin A-Modells um das Vierfache höher als der des entsprechenden Hydroxybiaryls **23**. Für das Biaryl **27** wurde eine fünfzehnfach niedrigere inhibitorische Konzentration im ATPase-Experiment ermittelt als für das Biaryl **19** ( $IC_{50}=0.95 \mu M$ ) (Tabelle 16). Ein ähnlicher Wert von  $0.91 \mu M$  wurde für das einfach amintosylierte Biaryl **45** ermittelt. Die polaren  $NO_2$ -funktionalisierten Verbindungen **35**, **36** und **38** wiesen eine 1.5-, 3- und 30-fach niedrigere inhibitorische Konzentration auf und das Biaryl **38** hatte den höchsten Effekt auf die ATPase-Aktivität des Myosin A-Modells mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $0.03 \mu M$  (Tabelle 16).

Tabelle 16: *In silico*-Gibbs-Energien und Ergebnisse der *in vitro* ATPase- und MST-Experimente.

N (Funktionalisierung)	$\Delta G_{\text{Docking}}$ (kcal/mol)	$\Delta G_{\text{LIE}}$ (kcal/mol)	IC <sub>50</sub> (μM)	K <sub>D</sub> (μM)
47 (TosNH   TosNH) Me-Ester	-8.45	-	Kein Effekt	-
7 (H   H)	-12.48	-0.29	114.8 ± 9.6	16.8 ± 2.0
23 (H   OH)	-10.13	-4.17	61.9 ± 14	9.6 ± 1.8
26 (OH   OH)	-11.40	-8.02	56.4 ± 6.1	-
50 (TosNBn   TosNBn)	-14.62	-	52.4 ± 13.5	-
34 (NH <sub>2</sub>   NH <sub>2</sub> )	-10.49	-4.53	45.2 ± 2.2	-
48 (TosNH   TosNH) Bn-Ester	-12.54	-	45.0 ± 3.2	-
22 (OH   OMe)	-11.29	-8.28	33.9 ± 10	-
41 (NH <sub>2</sub>   OMe)	-10.63	-6.77	27.4 ± 11.4	-
17 (OMe   OMe)	-10.77	-10.90	25.6 ± 8.5	1.9 ± 0.5
19 (H   OMe)	-11.96	-11.62	15.1 ± 3.6	1.3 ± 0.3
27 (OMe   OBn)	-11.78	-13.75	0.95 ± 0.17	-
45 (H   TosNH)	-12.69	-	0.91 ± 0.27	-
35 (NO <sub>2</sub>   NH <sub>2</sub> )	-13.22	-14.03	0.662 ± 0.07	0.63 ± 0.12
36 (NO <sub>2</sub>   OH)	-13.96	-13.96	0.285 ± 0.04	-
38 (NO <sub>2</sub>   NO <sub>2</sub> )	-11.86	-19.16	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.003

Zur Verifizierung der ermittelten Aktivitätswerte wurde die Affinität der Biaryle **7**, **23**, **17**, **19**, **35** und **38** im MST-Experiment quantifiziert. Die ermittelten  $K_D$ -Werte der Verbindungen weisen einen ähnlichen Trend auf wie die entsprechenden IC<sub>50</sub>-Werte der jeweiligen Verbindungen (Tabelle 16 und Abbildung 16).

Abbildung 17: Korrelationsdiagramm der IC<sub>50</sub>- und  $\Delta G$ -Werte.

Ebenfalls stehen die experimentell ermittelten Werte in einer guten Korrelation mit den anhand der LIE-Methode kalkulierten Werten der Gibbs-Energie vom jeweiligen Myosin A-Biaryl-Komplex (Abbildung 17).

#### 4.4 Ermittlung der Zytotoxizität der Biaryl-Derivate

Die toxische Wirkung von potentiellen Inhibitoren des parasitären Myosin A auf menschliche Zellen wurde an hcMEC/D3-Zelllinien (Blut-Hirn-Schranke) getestet. Der Wert der mittleren zytotoxischen Konzentration ( $CC_{50}$ -Wert) spiegelte die Zytotoxizität wieder. Die ermittelten Werte wurden in Relation zur mittleren inhibitorischen Konzentration gestellt und der Quotient stellt den Selektivitätsindex (**SI**) der jeweiligen Substanz dar (Tabelle 17).

**Tabelle 17: Übersicht und Vergleich der ermittelten  $CC_{50}$ - und  $IC_{50}$ -Werte von Biarylen.**

N	Funktionalisierung	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$CC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	SI
47	TosNH   TosNH Me-Ester	Kein Effekt	>500	-
7	H   H	114.8±9.6	781±34	7
23	H   OH	61.9±14	>800	>13
26	OH   OH	56.4±6.1	259±21	5
50	TosNBn   TosNBn	52.4±13.5	836±60	16
34	NH <sub>2</sub>   NH <sub>2</sub>	45.2±2.2	>250	>6
48	TosNH   TosNH	45.0±3.2	221±3.3	5
22	OH   OMe	33.9±10	≈1000	29
41	NH <sub>2</sub>   OMe	27.4±11.4	>500	>19
17	OMe   OMe	25.6±8.5	735±1.4	28
19	H   OMe	15.1±3.6	393±23	26
27	OMe   OBn	0.95±0.17	1000±53	1052
45	H   TosNH	0.91±0.27	1027±43	1128
35	NO <sub>2</sub>   NH <sub>2</sub>	0.662±0.07	465±49	702
36	NO <sub>2</sub>   OH	0.285±0.04	244±5	856
38	NO <sub>2</sub>   NO <sub>2</sub>	0.032±0.007	1142±130	35687

Der  $CC_{50}$ -Wert des Biaryls **7** betrug 780  $\mu\text{M}$ . Aufgrund eines hohen  $IC_{50}$ -Wertes der Verbindung wurde ein niedriger Selektivitätsindex von 7 erreicht. Die symmetrische *ortho*-Funktionalisierung der Struktur mit Hydroxy-, Amino- oder Tosylaminogruppen führte zur Erhöhung des toxischen Effektes (Biaryle **26**, **34** und **48**). Bei nahezu gleichen  $IC_{50}$ -Werten lagen die ermittelten  $CC_{50}$ -Werte der Verbindungen bei ca. 250  $\mu\text{M}$ . Hingegen wurde für die entsprechenden asymmetrischen Biaryle **23** und **45** eine geringere Toxizität im Konzentrationsbereich von 800  $\mu\text{M}$  bis 1000  $\mu\text{M}$  ermittelt. Der niedrige  $IC_{50}$ -Wert des Biaryls **45** erhöhte den Selektivitätsindex der tosylierten

Verbindung um das 225-fache im Vergleich zum entsprechenden symmetrischen Biaryl **48** (Tabelle 17). Ebenfalls wurde die Toxizität des aminotosylierten Biaryls **48** durch eine zusätzliche Substitution der Amine mit Benzylfunktionen bis auf einen Wert von 836  $\mu\text{M}$  verringert. Aufgrund der im Vergleich zum Biaryl **45** fünfzigfach niedrigeren Aktivität gegenüber der ATPase-Aktivität des Myosin A lag der Selektivitätsindex im Bereich von 16 und ist somit mit dem des Biaryl **23** vergleichbar ( $\text{SI} > 13$ ). Die Biaryle mit einem Potential von Wasserstoffbrückendonoren an beiden Ringen des biarylischen Grundgerüsts weisen somit einen vergleichsweise hohen toxischen Effekt auf die menschlichen Zellen der Blut-Hirn-Schranke auf.

Der toxische Effekt der methoxyfunktionalisierten Biaryle folgt hingegen einem umgekehrten Trend. Für die einseitig funktionalisierte Verbindung **19** wurde eine mittlere toxische Konzentration von 400  $\mu\text{M}$  ermittelt, wogegen der  $\text{CC}_{50}$ -Wert des symmetrischen Derivates **17** mit 735  $\mu\text{M}$  fast verdoppelt ist. Die Kombination der Methoxyfunktionalisierung mit polaren  $\text{NH}_2$ - und  $\text{OH}$ -Gruppen, sowie der sterisch überfrachteten Benzyloxygruppe äußerte sich in einer weiteren Herabsetzung der toxischen Wirkung auf  $\text{CC}_{50}$ -Werte von über 500  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$ . Die asymmetrische Funktionalisierung des biarylischen Grundgerüsts durch die polare  $\text{NO}_2$ -Gruppe in Kombination mit  $\text{OH}$ - und  $\text{NH}_2$ -Gruppen (**35** und **36**) führte zur Verringerung der  $\text{IC}_{50}$ - und  $\text{CC}_{50}$ -Werte (Tabelle 17). Der Selektivitätsindex wurde durch die etwas stärkere Herabsetzung der inhibitorischen Konzentration dennoch erhöht. Die mittlere zytotoxische Konzentration des symmetrischen Inhibitors **38** mit den polaren  $\text{NO}_2$ -Gruppen wurde genau wie für die asymmetrischen sterisch überfrachteten Inhibitoren **45** und **27** im millimolaren Konzentrationsbereich ermittelt. Der Quotient aus dem hohen  $\text{CC}_{50}$ - und dem niedrigen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 0.032  $\mu\text{M}$  ergibt für das Biaryl **38** den höchsten SI-Wert im Bereich von 35000 (Tabelle 17).

Die Biaryle **27**, **35**, **36**, **38** und **45**, für die innerhalb des Aktivitätsassays *in vitro* das höchste inhibitorische Potential ermittelt wurde, weisen eine niedrige Zytotoxizität gegenüber den getesteten menschlichen Zellen, wodurch vergleichsweise hohe Selektivitätswerte von 1000 bis 35000 erreicht werden.

## 4.5 Effekt auf die parasitäre Entwicklung im Blutstadium

### 4.5.1 Effekt der Biaryle auf die Zellproliferation des *P. falciparum*

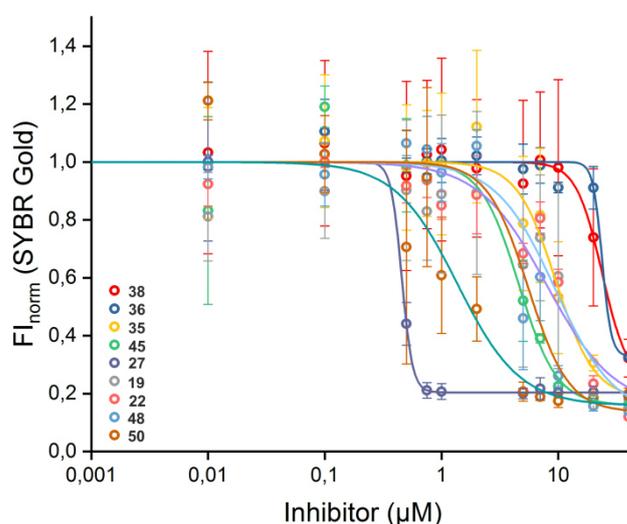
Der Effekt der synthetisierten Biaryle auf die Zellproliferation von *Plasmodium falciparum* wurde mittels eines 96 h Inkubationsassays untersucht. Der parasitäre *Pf*-

Stamm 3D7 wurde dafür unterschiedlichen Konzentrationen von ausgewählten Biarylen ausgesetzt (Tabelle 18 und Diagramm 2).

**Tabelle 18: Ergebnisse der EC<sub>50</sub>-Bestimmung mit den entsprechenden IC<sub>50</sub>-Werten.**

Inhibitor	Funktionen	CC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)	EC <sub>50</sub> (μM)
<b>38</b>	NO <sub>2</sub>  NO <sub>2</sub>	1142.9 ± 130	0.032 ± 0.01	23.7 ± 5.7
<b>36</b>	NO <sub>2</sub>  OH	244.3 ± 5.1	0.285 ± 0.04	23.7 ± 12.0
<b>35</b>	NO <sub>2</sub>  NH <sub>2</sub>	465.1 ± 49.4	0.662 ± 0.1	9.5 ± 1.4
<b>45</b>	TosNH H	1027 ± 43.5	0.91 ± 0.3	4.75 ± 1.09
<b>27</b>	MeO OBn	1000 ± 53	0.95 ± 0.2	0.44 ± 0.06
<b>19</b>	MeO H	393,7 ± 23	15.1 ± 3.6	7.9 ± 1.7
<b>22</b>	MeO OH	≈1000	33.9 ± 10.2	9.44 ± 1.3
<b>48</b>	TosNH TosNH	221 ± 3.3	45.0 ± 3.2	5.51 ± 0.86
<b>50</b>	TosNBn TosNBn	836 ± 60	52.4 ± 13.5	1.37 ± 0.39

Trotz des hohen inhibitorischen Potentials gegen die ATPase-Aktivität des Myosin A-Modells, zeigten die nitrofunkionalisierten Verbindungen **38**, **36** und **35** einen niedrigen inhibitorischen Effekt auf die parasitäre Proliferation. Die EC<sub>50</sub>-Werte dieser Biaryle lagen jeweils bei 24 μM und 10 μM. Ein vergleichbarer Effekt mit den EC<sub>50</sub>-Werten von 8-10 μM wurde für die asymmetrischen methoxy- und hydroxyfunkionalisierten Inhibitoren **19** und **22** ermittelt.



**Diagramm 2: Auftragung der normierten Fluoreszenz gegen die Konzentration des Inhibitors in μM.**

Das Fluoreszenzsignal resultiert von der mit SYBR Gold markierten DNA des *Pf*-Stammes 3D7. Die Parasitämie wird zu Beginn des Experiments auf 1% eingestellt und die Verbindungen werden der Stammlösung unter Titrieren der Konzentration zugesetzt.

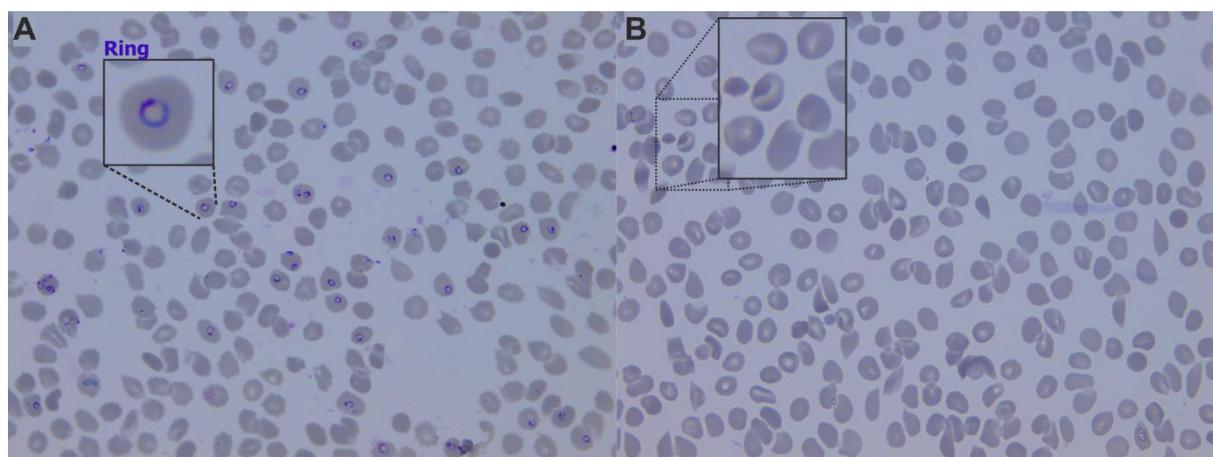
Für die asymmetrischen und symmetrischen tosylierten Biphenyle **45** und **48** wurde eine höhere inhibierende Wirkung mit den EC<sub>50</sub>-Werten von 5 μM festgestellt. Eine zusätzliche Benzylierung der Aminfunktion in Verbindung **50** führte zu einer leichten Erhöhung des inhibitorischen Effektes. Der EC<sub>50</sub>-Wert der Verbindung lag bei 1.4 μM.

Das asymmetrische, mit Benzyloxy- und Methoxygruppen funktionalisierte Biaryl **27** zeigte den höchsten inhibitorischen Effekt auf die Proliferation des Parasiten. Der  $EC_{50}$ -Wert betrug hierbei 440 nM (Diagramm 2 und Tabelle 18).

#### 4.5.2 Effekt auf die Zellproliferation über 24 h

Der Effekt der Biaryle auf die Zellproliferation, sowie die Glideosom-abhängige Invasion und *Egress* vom *Pf*-Stamm 3D7 wurde mittels einer Inkubation von 24 h mit 20  $\mu$ M der jeweiligen Verbindung untersucht. Der Effekt auf die Proliferation wurde mittels FACS-Analyse ermittelt. Zur Bestimmung des direkten Effektes auf die Wirtszellinvasion und den *Egress* wurden in einem Blutausstrich die durch die parasitären Ringe infizierten Erythrozyten (Invasion), sowie die nicht-geplatzten Schizonten (Inhibition des *Egress*) ausgezählt (Abbildung 18).

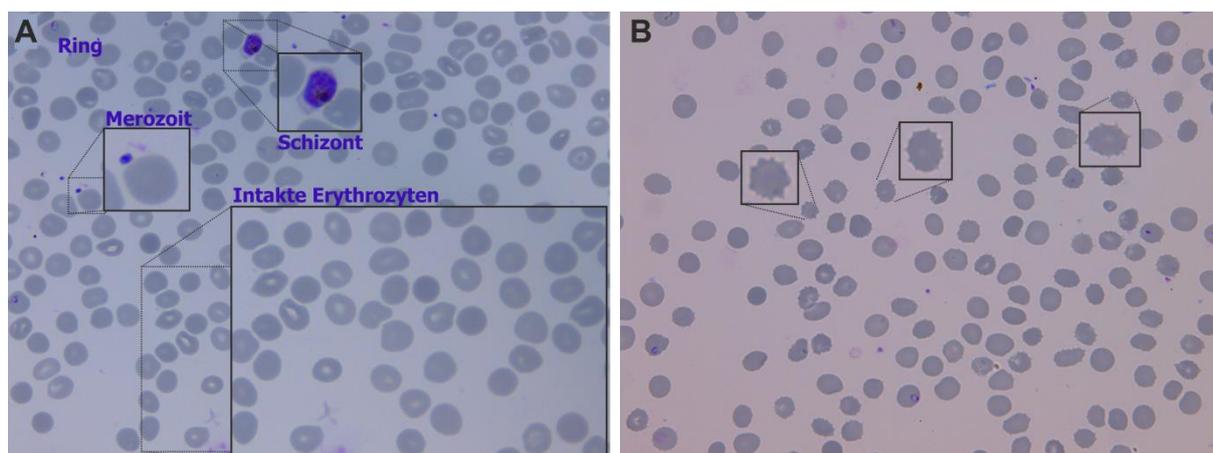
Alle Verbindungen zeigten einen Effekt auf das Ring/Erythrozyten-Verhältnis (Abbildung 20). Die Biaryle **38**, **19**, **35**, **22**, **36** und **48** setzten den Anteil an Ringen von 8% (DMSO-Kontrolle) auf 3% bis 2% herab, wodurch ein Effekt auf das Invasionsverhalten des Parasiten interpretiert werden kann, da das Ringstadium im Prozess der Entwicklung auf das Merozoitenstadium folgt und die Zunahme an infizierten Erythrozyten im Vergleich zu 1% Parasitämie zu Beginn des Experiments eine zuvor erfolgte Invasion bedeuten würde. Die Biaryle **27**, **50** und **45** reduzierten Anzahl der Ringe sehr stark, da nahezu vollständige Abwesenheit der parasitären Ringe in den aufgenommenen Proben festgestellt wurde (Abbildung 18 und Abbildung 20).



**Abbildung 18: Inhibierender Effekt der Biaryle auf die Parasitämie von *Plasmodium falciparum* 3D7.**

**A)** Blutausstrich der Zellenprobe nach 24 h Inkubationszeit ohne Inhibitor mit DMSO. 11% der Erythrozyten sind mit parasitären Ringen befallen. **B)** Blutausstrich der Zellenprobe nach 24 h Inkubationszeit in Anwesenheit des Inhibitors **27** (20  $\mu$ M). Der Anteil der befallenen Erythrozyten beträgt 0.3%.

Im Gegensatz zu den getesteten Biarylen mit einem starken (27, 50, 45, 19, 22), allerdings auch zu denen mit einem eher schwachen (48, 35, 36) inhibitorischen Effekt auf die Parasitämie wurde die Morphologie der Erythrozyten in den Experimenten unter Verwendung des symmetrischen nitrofunktionalisierten Biaryls 38 beeinträchtigt. Es wurden Deformationen und eine vermehrte Anzahl an stumpfen Fortsätzen an der Zelloberfläche beobachtet (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Vergleich der Morphologie der Erythrozyten.** **A)** Blutausstrich der Inkubationsprobe nach 24 h mit 20 µM 36 ( $EC_{50}=23.7 \pm 5.7 \mu\text{M}$ ). Die Anzahl der parasitären Ringe ist relativ zu den Kontrollexperimenten ohne Inhibitor stark reduziert. Im Ausstrich liegen nur zwei Erythrozyten vor, die mit dem Parasiten im Ringstadium befallen sind. Es sind sowohl freie Merozoiten als auch ein ungeplatzter Schizont zu sehen. Die Erythrozytenmorphologie entspricht der Normalform. Die konkave Beschaffenheit des zellulären Skelets ist erkennbar. **B)** Der Blutausstrich der Inkubationsprobe nach 24 h in mit 20 µM 38 ( $EC_{50}=23.7 \pm 12 \mu\text{M}$ ). Die Anzahl der parasitären Ringe ist ebenfalls stark reduziert. Die Morphologie der Erythrozyten ist zum Teil stark verändert (markierte und vergrößerte Zellen). Verformungen und Ausbildung von Fortsätzen sind erkennbar.

Diese Erscheinungen sind in den Proben mit der gleichen Konzentration von Inhibitor 36, der ebenfalls eine Nitrogruppe in seiner Struktur und den gleichen  $EC_{50}$ -Wert von  $\sim 24 \mu\text{M}$  für die Inhibierung der parasitären Proliferation aufweist, nicht gegeben (Abbildung 19).

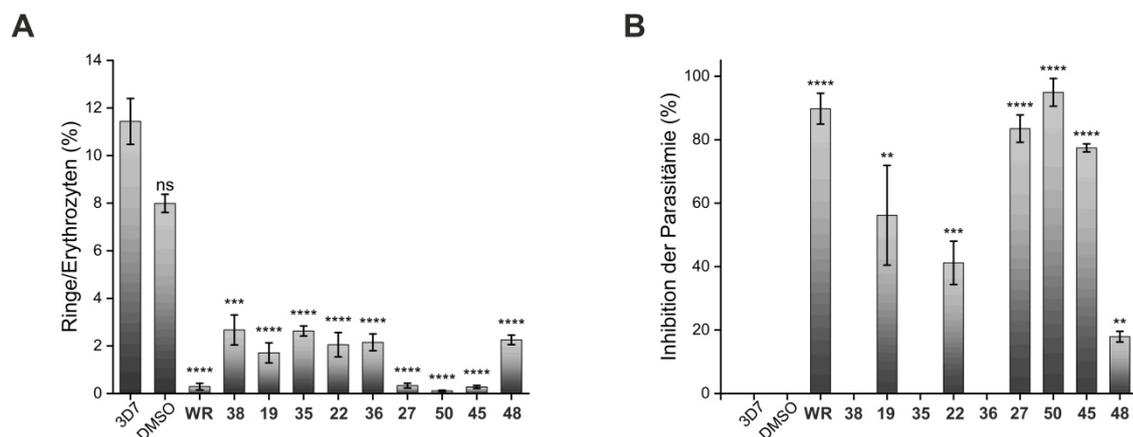
Die Inhibierung der Parasitämie durch die Substanzen innerhalb von 24 h wurde durch die Durchflusszytometrie (FACS=*fluorescence-activated cell sorting*) in Relation zur Kontrollprobe bestimmt (Formel 4).

$$IP(\%) = 100\% - \frac{(P_{\text{Probe}} - 1\%)}{(P_{\text{DMSO}} - 1\%)} \cdot 100 \quad \text{Formel 4}$$

Mit  $IP(\%)$  = Inhibierung der Parasitämie in %;  $P_{\text{Probe/DMSO}}$  = Parasitämie der jeweiligen Probe bzw. Probe mit DMSO; 1%-Abzug resultiert stets aus dem Wert der Parasitämie zu Beginn des Experimentes.

Für die nitrofunktionalisierten Biaryle 38, 36 und 35 konnte kein messbarer Effekt auf die Parasitämie innerhalb von den 24 h des Experimentes festgestellt werden. Das symmetrische aminotosylierte Biaryl 48 zeigte einen inhibierenden Effekt von etwa 20%, wogegen das asymmetrische Derivat 45 die Parasitämie mit einem Effekt von

80% einschränkte. Die weiteren asymmetrischen methoxyfunktionalisierten Biaryle **22** und **19** inhibierten die Parasitämie jeweils zu 40% und 60%. Das höchste Ausmaß an Parasitämieinhibition zeigten die asymmetrischen benzyloxy- und methoxy-, sowie aminosylfunktionalisierten Derivate **27** und **45**, sowie das symmetrische, sterisch überfrachtete Biaryl **50**. Die Inhibition der Parasitämie lag dabei entsprechend bei 85%, 80% und 95%. (Abbildung 20).



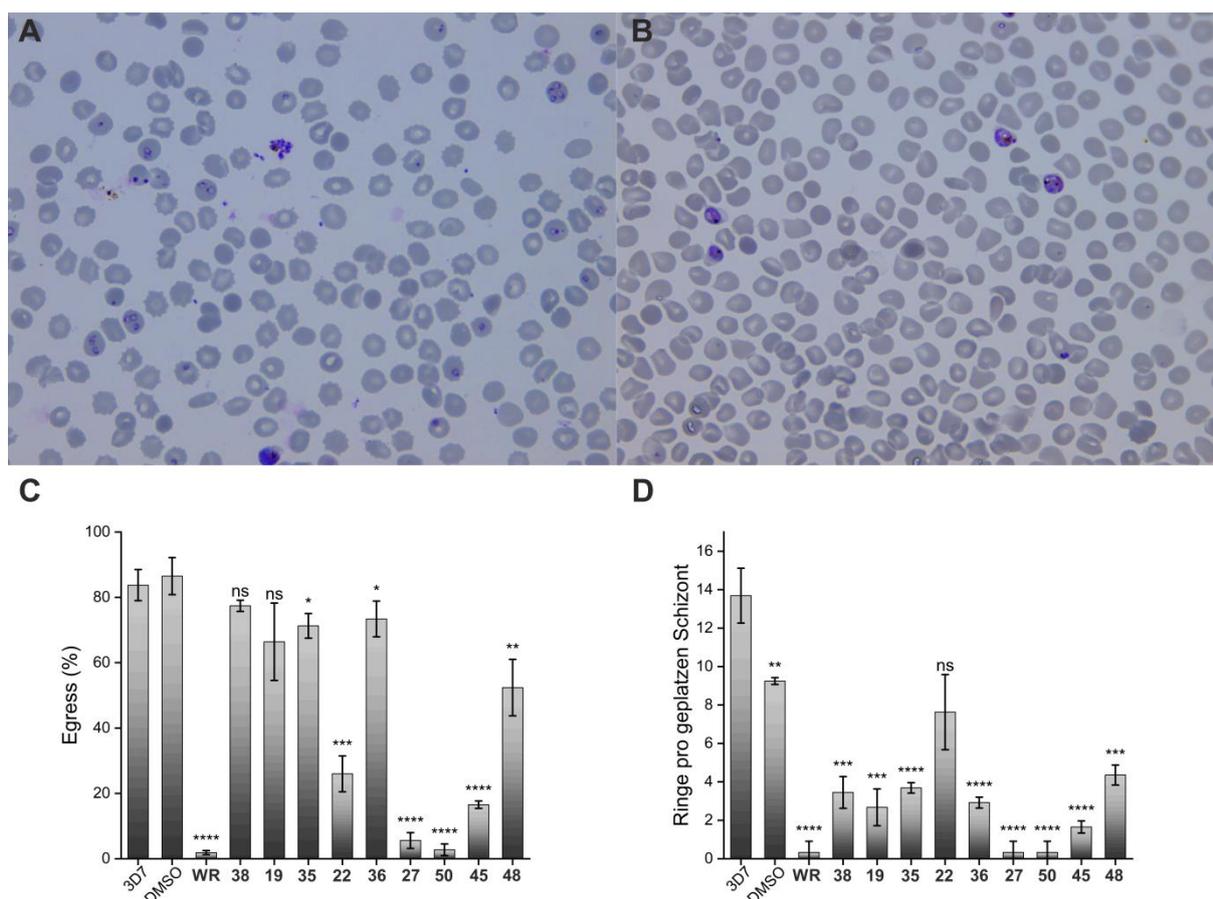
**Abbildung 20: Quantifizierung des Effektes der Biaryle auf die Proliferation des *Plasmodium falciparum*.** **A** und **B** Säulendiagramme zeigen die Quantifizierung der Inhibierenden Wirkung der getesteten Biaryle auf die Parasitenanzahl im Ringstadium im Verhältnis zur Anzahl der Erythrozyten in der Probe. **WR** dient als Positivkontrolle mit einem Inhibitor der Dehydrofolat-Reduktase (WR99210). **(A)** und die Parasitämie **(B)**. Die Signifikanz des jeweiligen Effektes wird durch den Hypothesentest bei zwei Stichproben mit dem Signifikanzniveau von mindestens 0.05 ermittelt und entweder durch das Kürzel ns (nicht signifikant) oder Sterne markiert. Die Sterne bedeuten die folgenden Signifikanzniveaus: \*  $\leq 0.05$ ; \*\*  $\leq 0.01$ ; \*\*\*  $\leq 0.001$ ; \*\*\*\*  $\leq 0.0001$ . WR=Positivkontrolle mit WR99210.

Nach dem Ringstadium erfolgt die Entwicklung des Parasiten zum Schizonten, in dem im Prozess der Schizogonie bis zu 30 neue invasionsfähige Merozoiten gebildet werden, die nach dem *Egress* (Ausbruchprozess) andere Erythrozyten invadieren können. Die Eindämmung der Schizogonie des *Pf*-Stammes 3D7 wurde anhand des Verhältnisses der Parasiten im Ringstadium zu der Zahl der geplatzen Schizonten quantifiziert. Dabei wurde die 1%-ige Parasitämie zu Beginn des Experimentes berücksichtigt (Formel 5 und Abbildung 21).

$$Egress(\%) = \frac{\left(N_{RBK \cdot \frac{1}{100}} - N_{Schizont}\right)}{\left(N_{RBK \cdot \frac{1}{100}}\right)} \cdot 100$$

Formel 5

Mit  $N_{RBK/Schizont}$  = Anzahl an Erythrozyten (rote Blutkörperchen = RBK) oder Schizonten.



**Abbildung 21: Eindrückung des Egress.** A und B) Blutausstriche der Probe nach 24 h Inkubationszeit des parasitären Mediums jeweils in Abwesenheit und Anwesenheit des Inhibitors (hier 50) in einer Konzentration von 20 µM. C und D) Inhibierung der Schizogonie durch die Biaryle. WR dient als Positivkontrolle mit einem Inhibitor der Dehydrofolat-Reduktase (WR99210). C) Anteil der potentiell geplatzen Schizonten mit Berücksichtigung der 1%-igen Parasitämie zu Beginn des Experiments. D) Anteil der während des Experiments entstandenen Ringe pro geplatzen Schizont. Die Signifikanz des jeweiligen Effektes wird durch den Hypothesentest bei zwei Stichproben mit dem Signifikanzniveau von mindestens 0.05 ermittelt und entweder durch das Kürzel ns (nicht signifikant) oder Sterne markiert. Die Sterne bedeuten die folgenden Signifikanzniveaus: \* ≤0.05; \*\* ≤0.01; \*\*\* ≤0.001; \*\*\*\* ≤0.0001. C und D) Signifikanz des Effektes seitens der Biaryle wurde in Bezug auf die DMSO-Kontrolle ermittelt. Signifikanz des DMSO-Effektes wurde in Bezug auf das 3D7-Experiment ermittelt.

Das *Egress* der ausgereiften Merozoiten aus dem Schizonten wurde durch die nitro-funktionalisierten Verbindungen **38**, **35**, **36**, sowie durch das asymmetrische, methoxyfunktionalisierte Biaryl **19** in Relation zur DMSO-Kontrolle und der 3D7-Negativprobe wenig bis gar nicht inhibiert. Das symmetrische, aminotosylierte Biaryl **48** setzte das *Egress* signifikant auf etwa 50% herab, während in Anwesenheit des asymmetrischen Derivates **45** der Prozess bei 20% der Schizonten stattfand. Ein ähnlicher Wert von 30% wurde mit dem Biaryl **22** erreicht. Die höchsten Effekte wurden durch das benzyloxy- und methoxyfunktionalisierte Biaryl **27** und den sterisch überfrachteten Inhibitor **50** hervorgerufen (Abbildung 21).

Das *Egress* wurde durch die meisten Verbindungen in Relation zur DMSO-Kontrolle signifikant herabgesetzt (Abbildung 21). Für die aktivsten Verbindungen **27** und **50**, sowie für die Positivkontrolle mit WR99210 (WR) wurde der *Egress* von allen zu

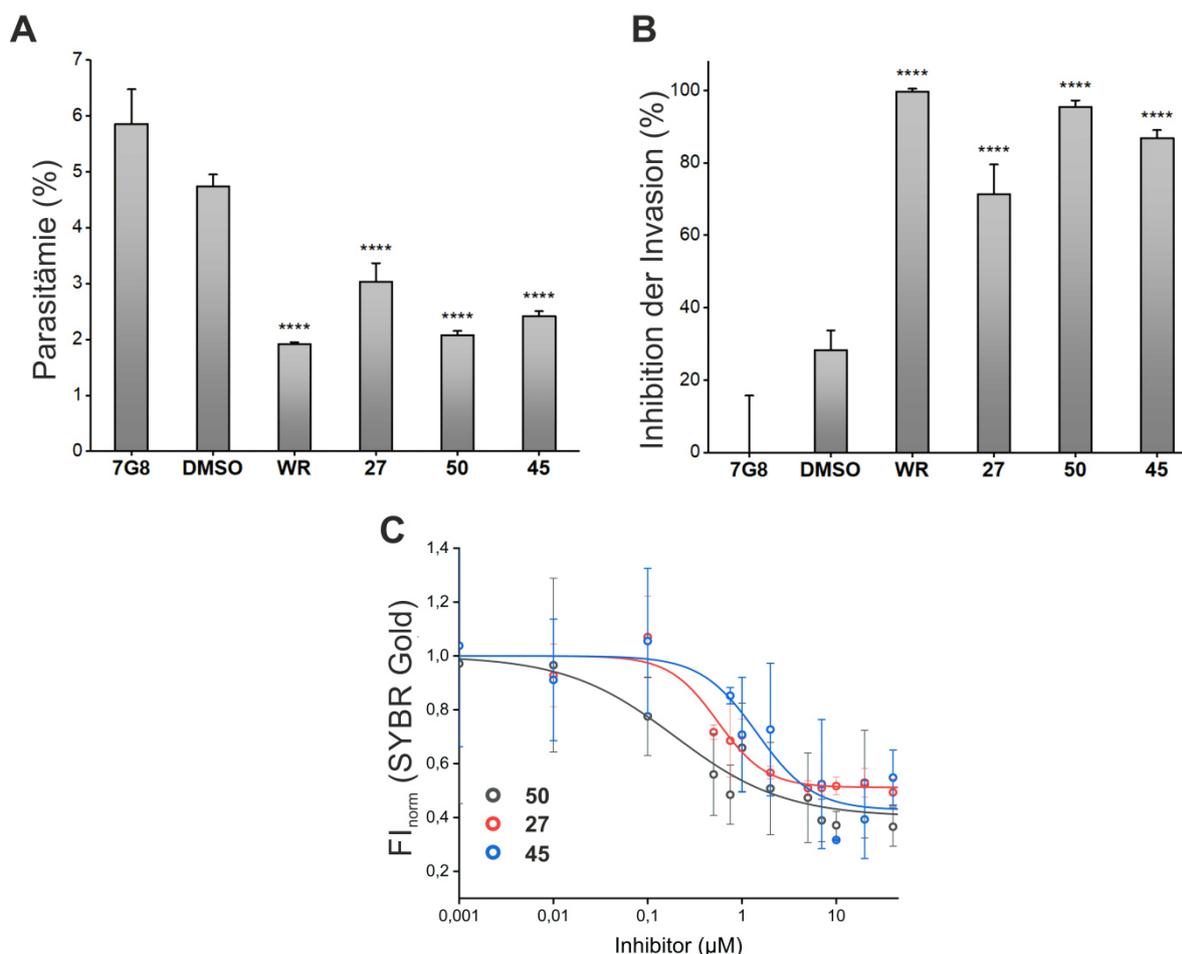
Beginn des Experimentes vorhandenen bzw. heranreifenden Schizonten gehemmt. Im Assay mit dem Biaryl **22**, der das Egress bis zum Wert von 30% eindämmte, war die Anzahl der Ringe mit deren Anzahl im Kontrollexperiment (WR) vergleichbar. Die Anzahl der Ringe pro geplatzten Schizont wurde durch Biaryle **38**, **19**, **35**, **36** und **48**, die einen sehr schwachen bis mittleren Effekt auf den Egress des Parasiten aufwiesen, von 10 auf 4 signifikant reduziert. Das Biaryl **45** reduzierte sowohl den *Egress* als auch die Anzahl der Ringe pro geplatzten Schizont mit einer signifikanten Wirkung (Abbildung 21).

#### 4.5.3 Effekt auf die Zellproliferation des resistenten *Pf*-Stammes 7G8

Die Verbindungen mit der höchsten Effektivität gegenüber der Proliferation des *Pf*3D7-Stammes wurden auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber dem resistenten *Pf*7G8-Stamm in einem weiteren Proliferationsassay über 96 h untersucht. Die Resistenzen des Stammes äußern sich gegenüber den in den Behandlungen verwendeten Wirkstoffen Chloroquin, Pyrimethamin und Cycloguanil, deren pharmakologische Wirkung nicht das hier betrachtete Glideosom beeinträchtigen sollte<sup>109,110</sup>. Falls somit der Effekt der Biaryle tatsächlich gegen das parasitäre Glideosom gerichtet ist, sollten die Biaryle eine ähnliche Aktivität gegen *Pf*7G8 und 3D7 besitzen.

Die mittlere effektive Konzentration der getesteten Biaryle **27** und **45** lag jeweils im oberen nano- oder unteren mikromolaren Bereich (Abbildung 22 C und Tabelle 19). Diese Konzentrationen sind mit den Werten aus den Experimenten mit dem 3D7-Stamm vergleichbar. Die effektive Konzentration des Biaryls **50** ist hingegen mit dem Wert von 0.19  $\mu\text{M}$  zehnfach niedriger als im Experiment mit *Pf*-Stamm 3D7 (1.37  $\mu\text{M}$ ; Tabelle 19).

Die Parasitämie sowie die Invasion des Parasiten in die Erythrozyten wurde durch die Biaryle **27**, **45** und **50** signifikant gehemmt (Abbildung 22 A und B). Die Parasitämie wurde im Vergleich zum Kontrollexperiment in Abwesenheit der Inhibitoren von 5% auf 2% bis 3% signifikant herabgesetzt (Abbildung 22 A). Die parasitäre Invasion wurde durch das asymmetrische Biaryl **27** um 70% signifikant reduziert. Mit dem ebenfalls unsymmetrischen, aminotosylierten Biaryl **45** sowie dem sterisch überfrachteten Biaryl **50** wurde dieser Effekt auf 90% bzw. 95% erhöht (Abbildung 22 B).



**Abbildung 22: Ergebnisse der Experimente mit dem *Pf*-Stamm 7G8.** **A** und **B**) Säulendiagramme zeigen die Quantifizierung der Inhibierenden Wirkung der getesteten Biaryle auf die Parasitämie (**A**) und die Invasion (**B**). **WR** dient als Positivkontrolle mit einem Inhibitor der Dehydrofolat-Reduktase (WR99210). Die Signifikanz des jeweiligen Effektes wird durch den Hypothesentest bei zwei Stichproben mit dem Signifikanzniveau von mindestens 0.05 ermittelt und entweder durch das Kürzel ns (nicht signifikant) oder Sterne markiert. Die Sterne bedeuten die folgenden Signifikanzniveaus: \*  $\leq 0.05$ ; \*\*  $\leq 0.01$ ; \*\*\*  $\leq 0.001$ ; \*\*\*\*  $\leq 0.0001$ . Die Signifikanz des Effektes seitens der Biaryle wurde in Bezug auf die DMSO-Kontrolle ermittelt. **WR**=Positivkontrolle mit WR99210. **C**) Auftragung der normierten Fluoreszenz gegen die Konzentration des Inhibitors in  $\mu\text{M}$ . Das Fluoreszenzsignal resultiert von der mit SYBR Gold markierten DNA des *Pf*-Stammes 7G8. Die Parasitämie wird zu Beginn des Experiments auf 1% eingestellt und die Stammlösung in mehrere Proben unter Titrieren der Konzentration des Inhibitors mit Dreifachbestimmung aufgeteilt.

**Tabelle 19: Ergebnisse der EC<sub>50</sub>-Bestimmung mit dem resistenten *Pf*7G8-Stamm.**

Inhibitor	Funktionen	EC <sub>50</sub> (µM) 3D7	EC <sub>50</sub> (µM) 7G8
27	MeO OBn	0.44 ± 0.06	0.55 ± 0.14
45	TosNH H	4.75 ± 1.09	1.39 ± 0.74
50	TosNBn TosNBn	1.37 ± 0.39	0.19 ± 0.09

## 4.6 Hintergrund des inhibierenden Effektes auf das parasitäre Myosin A

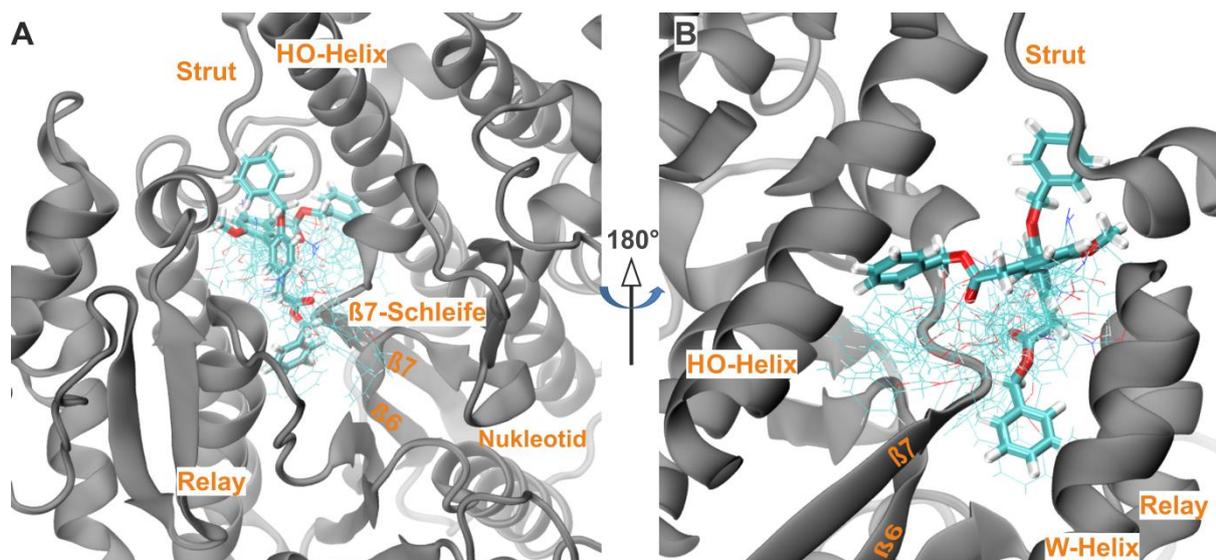
### 4.6.1 *In silico* Ermittlungen der Struktur-Aktivitätsbeziehung

Die *in vitro* Experimente mit isolierten Modell des Myosin A als auch mit den parasitären Stämmen 3D7 und 7G8 zeigten, dass die aus dem strukturbasierten Ansatz abgeleiteten *ortho*-Funktionalisierungen die inhibierende Wirkung der Biaryle auf das

parasitäre Glideosom erhöhen. In den MD-Simulationen mit den Myosin A-Biaryl-Komplexen wurden Positionen und Interaktionen aller Inhibitorenmoleküle in der allosterischen Tasche des Myosin A weiter analysiert, um eine potentielle Erklärung für die Inhibierung zu finden. Die Positionierung über der  $\beta$ 7-Schleife wurde nahezu für alle Biaryle als die stabile Position ermittelt (Abbildung 11 und Abbildung 23). Die benzyllischen Esterfunktionen reichten in die Bereiche zwischen den  $\beta$ 7- und  $\beta$ 6-Strängen auf der Seite der Nukleotidbindestelle sowie zwischen die HO-Helix und den  $\beta$ 7-Strang auf der Seite der HO-Helix. Die funktionellen Gruppen der *ortho*-Positionen wurden entsprechend der Lage des Grundgerüsts in den Bereich der *Cleft* gefunden (Abbildung 23). Bei den Biarylen **50** und **48** wurde aufgrund der sterischen Überfrachtung der Tosylamino- und *N*-benzyl-*N*-tosylfunktionen eine Verschiebung des biarylischen Grundgerüsts in Richtung der W-Helix beobachtet. Die Esterfunktion auf der Seite des Nukleotids wurde dadurch höher zur *Strut*-Schleife verschoben und die Carbonylgruppe interagierte mit LYS274.

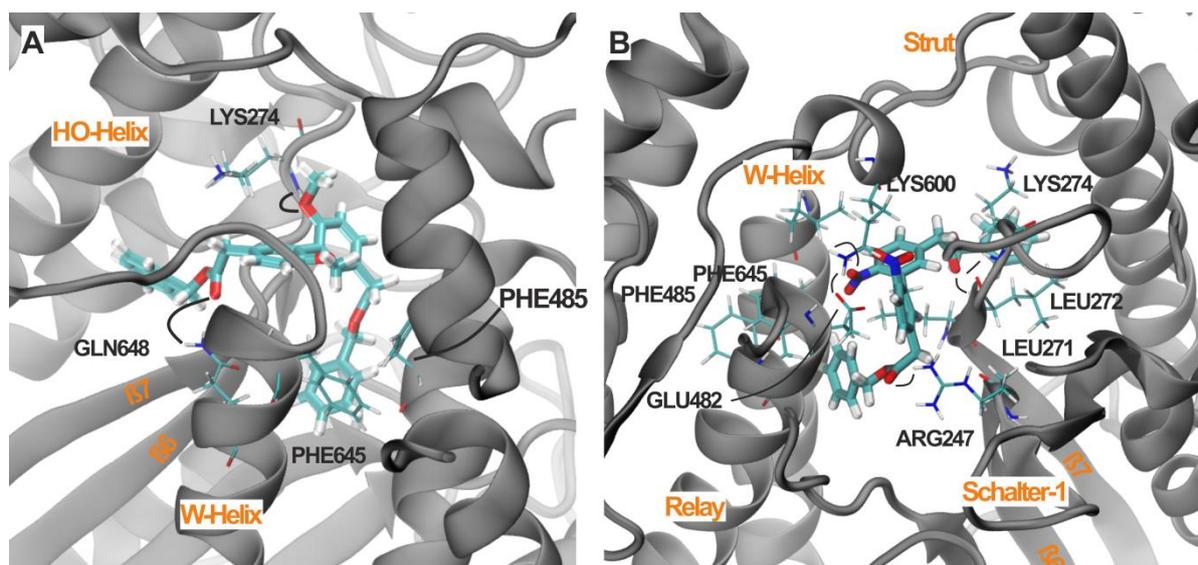
Die Hauptinteraktionen aller Inhibitoren, die von den Esterfunktionen ausgehen, fanden vor allem mit den Aminosäuren der  $\beta$ 7-Schleife LEU271, LEU272, LYS274 und SER275 statt. Einige dieser Interaktionen gingen bei den Inhibitoren **7** und **26**, sowie **50** und **48** jeweils aufgrund der starken Verschiebungen in die Bereiche der W-Helix und der HO-Helix verloren. Bei den tosylaminofunktionalisierten Verbindungen (**50** und **48**) wurde der Kontaktverlust zur  $\beta$ 7-Schleife durch die Interaktion der  $\text{SO}_2$ -Gruppe mit dem Rückgrat des LEU271 und 272 kompensiert.

Die aromatischen Bereiche der Biaryle (Benzyllische Esterfunktionen und Grundkörper) waren im jeweiligen Bereich in Wechselwirkungen mit aromatischen Aminosäuren wie PHE444 (HO-Helix), PHE471 (Schalter-2), PHE485 (*Relay*-Helix) und PHE645 (W-Helix).



**Abbildung 23: Allgemeine Positionierung der Inhibitoren mit dem biarylischen Grundgerüst innerhalb der MD-Simulationen der *in silico* Struktur-Aktivitätsbeziehungsstudie. A und B)** Alle Inhibitormoleküle sind als Linien dargestellt. **27** (Stäbchen-Darstellung) repräsentiert die allgemeine Positionierung der Biaryle innerhalb der *Cleft*. Das benzyliche Grundgerüst ist über dem  $\beta 7$ -Loop positioniert. Die benzylichen Ester sind um den  $\beta 7$ -Loop platziert und reichen jeweils in die Bereiche der Nukleotidseite und zur HO-Helix. Die Funktionen der *ortho*-Positionen sind im Bereich der *Cleft*-Öffnung.

Die Funktionalisierung des biarylischen Grundgerüsts in den *ortho*-Positionen mit den Hydroxy-, Methyl-, Amino- und Nitrofunktionen erhöhte die Anzahl an polaren Wechselwirkungen. Bei den aminfunktionalisierten Biarylen war allerdings ein erhöhter solvatisierender Effekt der Wassermoleküle festzustellen, wodurch die polaren Interaktionen zu den Aminosäuren der allosterischen Tasche nicht ausgebildet wurden. Vor allem bei der symmetrischen Funktionalisierung durch Methoxy- und Nitrofunktionen war eine leichte Veränderung der Inhibitorposition in Richtung der Nukleotidbindestelle auffällig (Abbildung 24). In beiden Fällen wurde das Molekül durch eine Interaktion eines der beiden *ortho*-Substituenten mit dem Rückgrat des LYS274 um die Biarylachse gedreht, wodurch die benzyliche Funktion des Esters auf der Seite des Nukleotids weiter in den Bereich zwischen der *Relay*- und der *W*-Helix in die Nähe der Phenylalanine 645 (*W*-Helix) und 485 (*Relay*-Helix) geschoben wurde (Abbildung 24). In den Simulationen mit den weiteren Biarylen ging die Interaktion mit diesen Phenylalaninen eher von dem aromatischen Grundgerüst des Biaryls aus.



**Abbildung 24:** Veränderungen der Position des Liganden aufgrund der symmetrischen MeO- und NO<sub>2</sub>-Funktionalisierung der *ortho*-Position zur Biarylachse. **A)** Biaryl **17** im Kontakt mit LYS274 über die Methoxygruppe auf der Seite des Nukleotids. Benzylgruppe zwischen der W- und Relay-Helices im Kontakt mit PHE645 und 485. Weiterer Kontakt zur W-Helix durch Carboxygruppe auf der Seite der HO-Helix. **B)** Position des Biaryls **38** vergleichbar mit der des **17**, allerdings mit höherer Anzahl der Kontakte. ARG247, LEU271 und 272, LYS274, GLU482, PHE485 und 645, LYS600 (Interaktionen durch Striche in schwarz hervorgehoben).

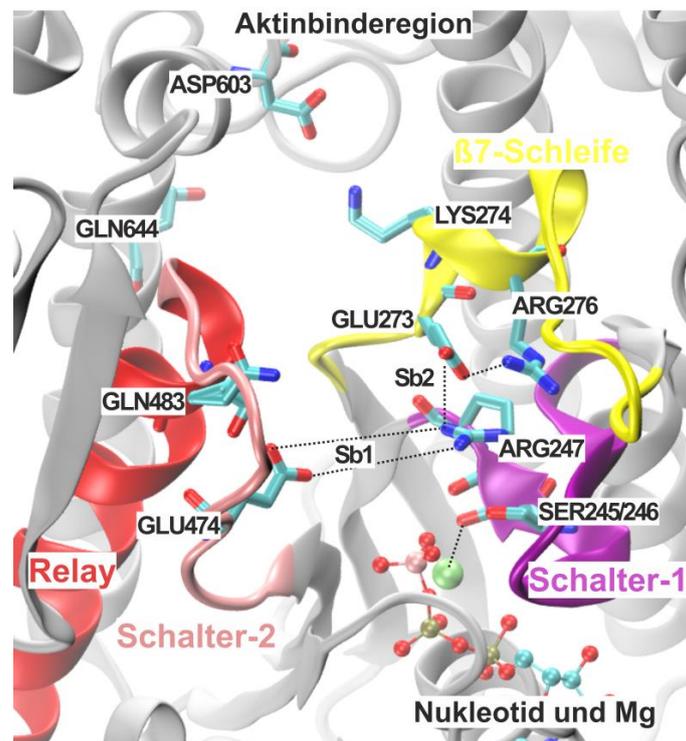
Bei dem Inhibitor **17** wurde dadurch eine weitere Bindung zur W-Helix (Seitenkette des GLN648) seitens der Carboxylgruppe auf der Seite der HO-Helix ermöglicht (Abbildung 24 A). Im Falle des Inhibitors **38** war das Molekül mit mehreren Sekundärstrukturbereichen im Kontakt. Aminosäuren LEU271, LEU272 und LYS274 sind Teile der  $\beta$ 7-Schleife, die jeweils mit beiden Carboxygruppen und einer der NO<sub>2</sub>-Gruppen interagierten. Hierdurch wurde eine tiefere Lage des Grundgerüsts an der  $\beta$ 7-Schleife erreicht, die eine direkte Interaktion mit dem Schalter-1 über das ARG247 durch die Carboxygruppe des Esters ermöglicht. Die direkte Interaktion mit dem ARG247, welches gemeinsam mit dem GLU474 die wichtigen Kommunikationselemente zwischen den Schaltern 1 und 2 ausmachen<sup>31</sup>, wurde in den Simulationen mit den anderen Biarylen nicht beobachtet. Die Interaktion war, falls vorhanden, stets über ein Wassermolekül vermittelt worden. Die verdrehte benzylische Funktion interagierte mit den Phenylalaninen 645 und 485, die jeweils Teile der W- und Relay-Helices darstellen. Das LYS600 der *Strut*-Schleife interagierte mit der NO<sub>2</sub>-Gruppe auf der Seite der HO-Helix. Zugleich wurde hier eine Interaktion des Lysins mit dem GLU482 der *Relay*-Helix festgestellt. Bei den Inhibitoren **36** und **35**, bei denen die NO<sub>2</sub>-Gruppe jeweils durch eine Hydroxy- und eine Aminofunktion ergänzt ist, wurde vor allem die Interaktion mit dem LYS274 durch die NO<sub>2</sub>-Gruppe erhalten. Hingegen gingen einige der beschriebenen Interaktionen aufgrund der Veränderung der Inhibitorlage verloren. Die NH<sub>2</sub>-Gruppe des Biarylmoleküls **35** wurde anstelle des

Benzyls auf der Nukleotidseite der allosterischen Tasche zwischen die Phenylalanine der *W*- und Relay-Helices geschoben, wodurch die diese mit den beiden Phenylalaninen 645 und 485 interagierten. Hierdurch wurden allerdings die aromatischen Interaktionen mit der HO-Helix nicht mehr ausgebildet. Die Lage des Biaryls **27** war mit der Lage des Biaryls **17** vergleichbar. Die sterische Beschaffenheit der Benzylgruppe trug zur stärkeren Verschiebung des Grundgerüsts hin zur  $\beta$ 7-Schleife bei. Zusätzlich erweiterte die Benzylfunktion die Anzahl an hydrophoben Wechselwirkungen mit der *Strut*-Schleife (LYS600 und ASP603) und verringerte die Energie des Protein-Biaryl-Komplexes.

#### 4.6.2 Allosterische Kommunikation innerhalb der *Cleft* des Myosin A

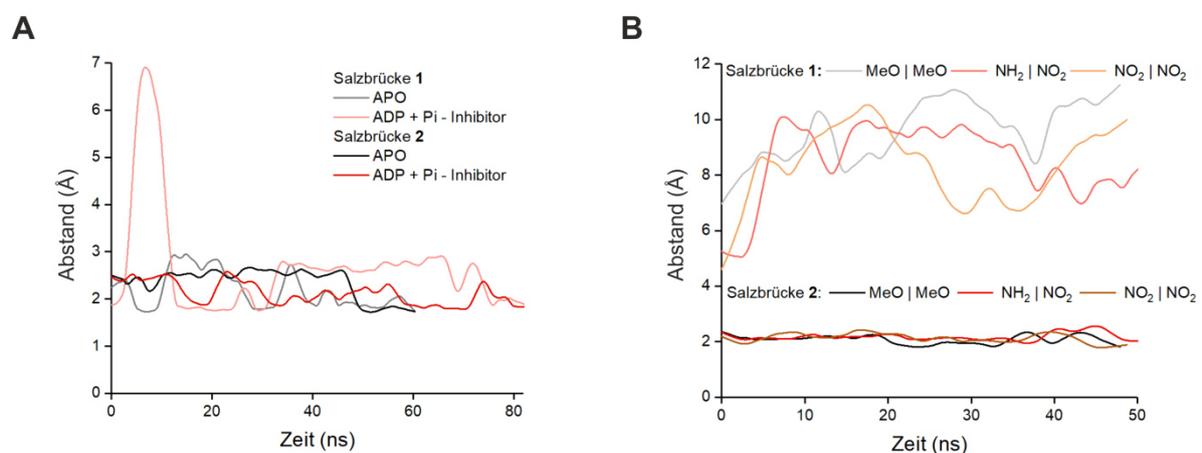
Innerhalb der MD-Simulationen wurden sowohl die Protein-Inhibitor-Interaktionen als auch die intramolekularen Wechselwirkungen in der allosterischen Tasche des Myosin A untersucht. Hierfür wurden die MD-Simulationen mit und ohne Inhibitormolekül verglichen. Durch die Interaktion zwischen ARG247 und GLU474 sowie GLU273 wurden zwei Salzbrücken ausgebildet. Die Interaktion mit GLU474 stellt die Salzbrücke zwischen Schalter-1 und Schalter-2 dar (im Folgenden Salzbrücke 1). Diese nimmt eine zentrale Rolle in der Interaktion der Schalter 1 und 2 ein, die in die Prozesse der ATP-Bindung, ATP-Hydrolyse und der Produktfreisetzung eingebunden sind<sup>49-51</sup>. Die Interaktion des ARG247 mit GLU273 stellt eine zweite Salzbrücke dar, die im Folgenden als Salzbrücke 2 bezeichnet wird. Beide Wechselwirkungen sind in den allosterischen Kommunikationspfad zwischen den Regionen der Aktin- und Nukleotidbindestelle eingebunden, der eine Aminosäuren-Interaktionskette um LYS274 beinhaltet (Abbildung 25)<sup>49,50</sup>. Hierbei wird die Aktinbinderegion durch die Interaktionen zwischen LYS274, ASP603 und GLN644 allosterisch moduliert. Untersuchungen von Behrens *et al.* zufolge werden durch die beiden Wechselwirkungen sowohl die basale ATPase-Aktivität des Myosin in Abwesenheit des Aktins als auch die Aktivierung der Freisetzung vom Hydrolyseprodukt gesteuert<sup>51</sup>. Die Aminosäuren um ARG247 und GLU474 steuern durch die Interaktionen mit einem Mg-Ion und dem ATP den Binde- und Hydrolyseprozess (Abbildung 25). Innerhalb von kristallographischen Untersuchungen von Chinthalapudi *et al.* wurde der Mechanismus aufgestellt, bei dem die Aminosäuren des Pfades zwei Wassermoleküle in der Nähe des Nukleotids koordinieren und die  $\gamma$ -Phosphatabspaltung durch das „helfende“ und „katalytische“ Wassermolekül begünstigen<sup>50,51</sup>. Demnach ist das „helfende“ Wasser-

molekül für die Koordinierung des katalytischen Moleküls entscheidend (PDB:2XEL<sup>50</sup>).



**Abbildung 25: Allosterischer Kommunikationspfad zwischen der Aktinbinderegion und der Nukleotidbindestelle mit den beteiligten Aminosäuren.** Der Kommunikationspfad beinhaltet LYS274, GLU273, ARG276 (alle  $\beta$ 7-Schleife, gelb), ARG247, SER245/246 (alle Schalter-1, violett), GLN483 (*Relay*), GLU474 (Schalter-2). Salzbrücke-1 (**Sb1**; zwischen ARG247 und GLU474), Salzbrücke-2 (**Sb2**; zwischen ARG247 und GLU273). LYS274 modifiziert durch die Interaktionen mit ASP603 und GLN644 den Bereich der Aktinbinderegion. Nukleotid ist das  $\text{ADP}\cdot\text{VO}_3$ , welches zur Verdeutlichung der Nukleotidbindestelle abgebildet wurde und stellt nicht einen Teil der MD-Simulation dar.

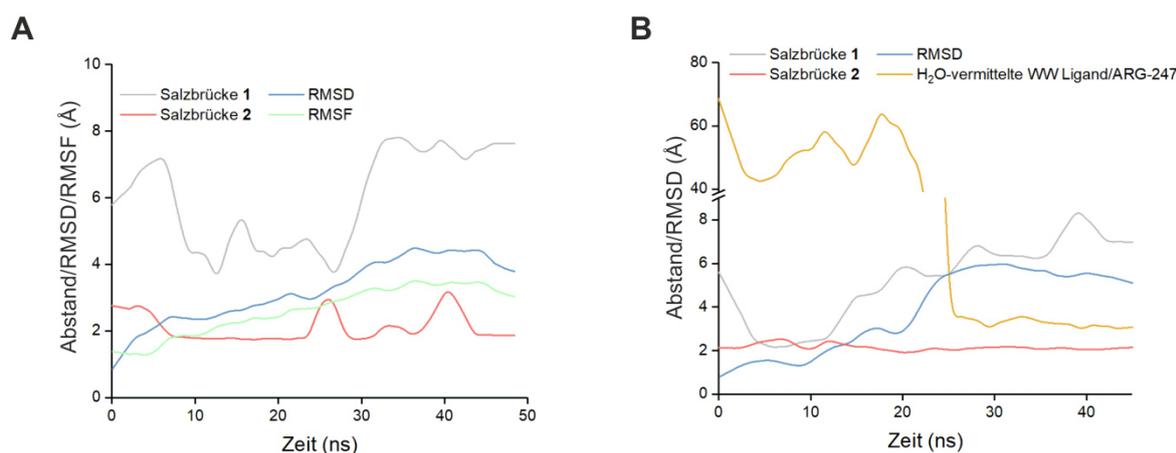
In den Simulationen des Myosin A in Abwesenheit des Nukleotids, sowie mit  $\text{ADP}+\text{P}_i$  als Nukleotid, die jeweils ohne Inhibitormolekül durchgeführt wurden, blieben beide Salzbrücken erhalten (Abbildung 26 A).



**Abbildung 26: Verhalten der Salzbrücken 1 und 2.** **A)** Verhalten der Salzbrücken 1 und 2 im apo-Zustand (Kurven in grau) und in Anwesenheit des Nukleotids  $\text{ADP}+\text{P}_i$  (Kurven in rot). **B)** Verhalten der Salzbrücken in Anwesenheit des Nukleotids  $\text{ADP}+\text{P}_i$  und der Inhibitoren 17 (Kurven in grau), 35 (Kurven in rot) und 38 (Kurven in orange).

Salzbrücke 1 wurde zu Beginn der Simulation aufgebrochen, wurde allerdings erneut aufgebaut und bestand genau wie Salzbrücke 2 über die gesamte Länge der Simulation. In der Anwesenheit der Inhibitoren wurde Salzbrücke 1 aufgebrochen und der Abstand zwischen den Aminosäuren ARG247 und GLU474 betrug etwa 9-10 Å. Salzbrücke-2 blieb dagegen erhalten. Der konstante und wenig fluktuierende Verlauf des Abstandes zwischen ARG247 und GLU273 lässt einen stabilisierenden Effekt der Inhibitoren auf diese Interaktion vermuten (Vergleich Abbildung 26 A und B).

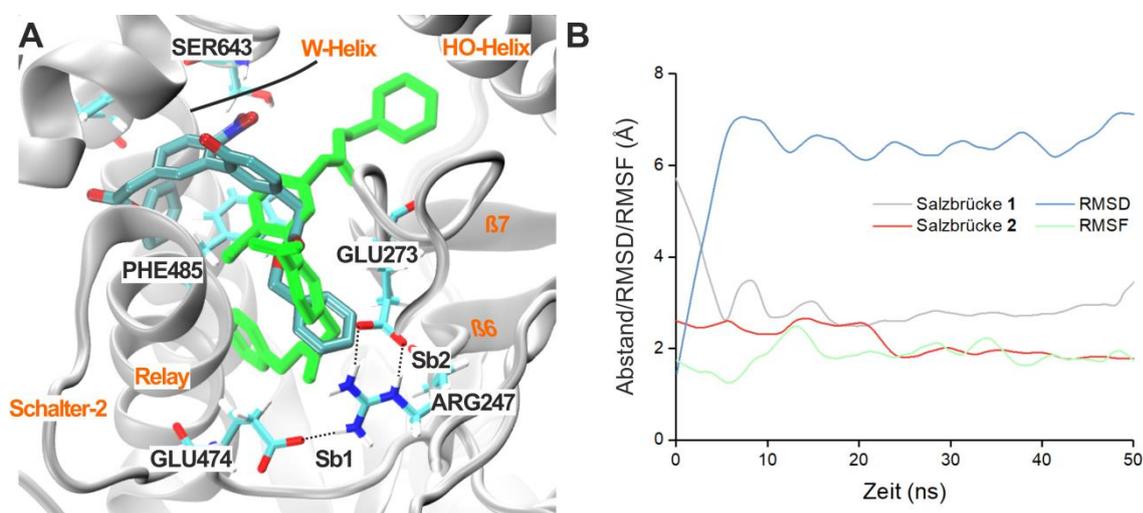
Das Verhalten wurde ausgehend von Positionen der Biaryle **34** und **23** überprüft. Diese wiesen eine abweichende Startposition auf und erreichten die für die meisten Biaryle als Standardposition ermittelte Lage erst nach dem Verrutschen des Moleküls im Laufe der Simulation (Abbildung 27). Das Verrutschen erfolgte ab der Mitte der Simulationen, nachdem die Salzbrücke-1 aufgebrochen wurde. Nach dem Aufbrechen der Salzbrücke ist der Verlauf des RMSD nahezu konstant, was auf die stabile Position des Inhibitormoleküls hindeutet (Abbildung 27 A und B). Die stabile Position der Biaryle **34** und **23** am Ende der Simulationen entsprach der Standardlage über der  $\beta 7$ -Schleife. Die zweite Salzbrücke blieb dabei über die gesamte Länge der Simulationen erhalten (Abbildung 27). In der MD-Simulation mit Biaryl **23** entstand nach dem Durchbrechen der Salzbrücke-1 eine über Wassermolekül vermittelte Wechselwirkung zwischen dem Rückgrat des ARG247 und der Carboxylgruppe der Esterfunktion (Abbildung 27 B).



**Abbildung 27: Verläufe der Salzbrücken 1 und 2 in den Simulationen mit spätem Erreichen der bevorzugten, als Standard ermittelten Position des biarylischen Inhibitors in der allosterischen Tasche.** **A)** Diagramme für die Simulation des Inhibitors **34** ( $\text{NH}_2|\text{NH}_2$ ). Die Salzbrücke 1 (grau) wird erst nach dem Erreichen der stabilen Position (blau und grün) gebrochen. Die Salzbrücke 2 bleibt bestehen (rot). RMSD und RMSF beschreiben die Position und das Fluktuationsverhalten des Inhibitormoleküls. **B)** Diagramme für die Simulation des Inhibitors **23** ( $\text{OH}|\text{H}$ ). Die Salzbrücke 1 (grau) wird erst nach dem Erreichen der stabilen Position (blau) und dem Aufbau der durch das Wassermolekül vermittelten Interaktion mit dem ARG247 (gelb) gebrochen. Die Salzbrücke 2 bleibt stabil (rot).

In den Kristallstudien von Chinthalapudi *et al.* wurde in der Anwesenheit des Inhibitors Pentachloropseudilin das „helfende“ Wassermolekül im Bereich des entsprechenden Arginins (im Schalter-1) vom *DdMyosin-2* gefunden. Wasservermittelte Interaktionen wurden in den Simulationen mit anderen Biarylen ebenfalls beobachtet, entstanden allerdings erst zum Ende der MD. Innerhalb dieser Simulation blieb das Wassermolekül ab der Mitte des Experimentes in Wechselwirkung mit ARG247 und der Estergruppe des Biaryls **23** (Abbildung 27 B).

Zur Verifizierung des Effektes seitens der Biaryle auf die beiden Salzbrücken wurde ebenfalls eine von der Standardlage über der  $\beta$ 7-Schleife abweichende Position des Biaryls **36** verwendet (Abbildung 28). In dieser Position befand sich der zweite Benzylester des Biaryls **36** nicht im Bereich zwischen der HO-Helix und dem  $\beta$ 7-Faltblatt, sondern zwischen der W- und Relay-Helix, weshalb das biarylische Grundgerüst in diesen Bereich gerichtet wurde (Abbildung 28 A). Das geringe Fluktuationsverhalten des Moleküls (RMSF) und ein konstanter Verlauf des RMSD verdeutlichen die Stabilität der alternativen Lage des Biaryls **36** (Abbildung 28 B). Das Salzbrückenverhalten wich von dem sonst in der Anwesenheit der Inhibitormoleküle beobachteten Verhalten ab. Beide Salzbrücken blieben über den gesamten Verlauf der MD-Simulation erhalten (Abbildung 28 B).

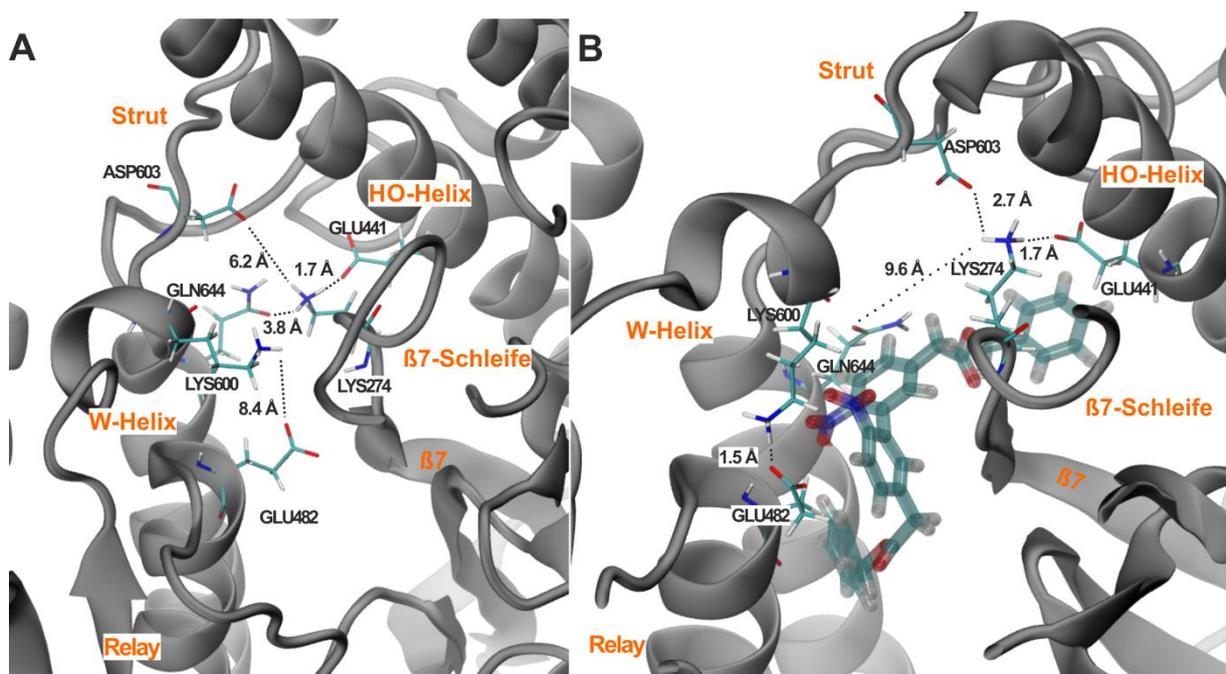


**Abbildung 28: Alternative Position des Biaryls 36.** A) Vergleich der alternativen Position des **36** (cyan) mit der Standardposition der Biaryligenanden (grün). Die Lage des Grundgerüsts zwischen den W- und Relay-Helices. Die salzbrückenbildende AS ARG247 und GLU474/273 sind in Wechselwirkung. B) Das Verhalten der Salzbrücken 1 (grau) und 2 (rot), sowie das RMSD (blau) und RMSF (grün) des Inhibitors in der abweichenden Position in der allosterischen Tasche. Beide Salzbrücken bleiben im gesamten Verlauf der Simulation erhalten.

Die Experimente in Abwesenheit der Biaryle sowie die Kontrollexperimente ausgehend von den abweichenden Positionen innerhalb der allosterischen Tasche verdeutlichen, dass die stabile Interaktion der Salzbrücke-2 sowie das Durchbrechen der

Salzbrücke-1 auf die Anwesenheit und Interaktionen mit den Biarylen zurückzuführen sind.

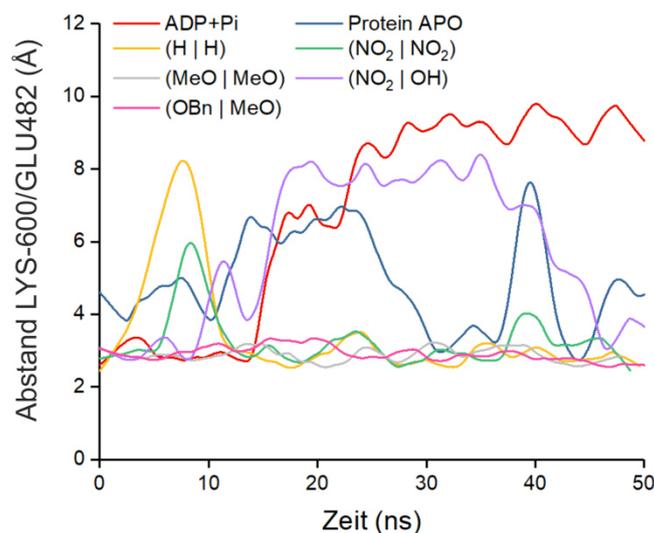
Die Interaktion des LYS274 ( $\beta$ 7-Schleife) mit ASP603 (*Strut*-Schleife) und GLN644 (*W*-Helix) innerhalb der MD-Simulationen wurde ebenfalls auf die Veränderungen durch die Anwesenheit des jeweiligen Biaryls in der Standardposition untersucht (Abbildung 29).



**Abbildung 29: Interaktionen im Bereich um das Lysin 274 mit und ohne Inhibitor.** **A)** MD-Simulation ohne Inhibitor und mit ADP+P<sub>i</sub> in der Nucleotidbindestelle. LYS274 ist im Kontakt mit GLU441 (1.7 Å), GLN644 (3.8 Å). ASP603 ist relativ weit vom LYS274 entfernt (6.2 Å). Der Kontakt zwischen GLU482 und LYS600 geht während der Simulation verloren (Abstand zum Ende:8.4 Å). LYS600 wird in die Richtung des LYS247 bewegt. **B)** MD-Simulation in Anwesenheit des Liganden und mit ADP+P<sub>i</sub> in der Nucleotidbindestelle. Der Kontakt zwischen LYS274 und GLN644 kommt nicht zu Stande (Abstand am Ende:9.6 Å). Der Kontakt seitens ASP603 und GLU441 zum LYS274 (2.7 Å und 1.7 Å), sowie zwischen GLU482 und LYS600 (1.5 Å) wird durch das Inhibitormolekül verstärkt.

In Simulationen in Abwesenheit von Inhibitor wurde der Kontakt des LYS274 sowohl mit ASP603 als auch mit GLN644 festgestellt (Abbildung 29 A). In Simulationen mit einem Inhibitormolekül war die Interaktion des LYS274 mit ASP603 ermöglicht, während die mit GLN644 durch den *ortho*-Substituenten und die damit verbundenen Interaktionen blockiert wurde. Ebenfalls wurde die Interaktion des ASP603 mit LYS274 durch die Interaktion des LYS600 (*Relay*-Helix) mit dem GLU482 (*Strut*-Schleife) begünstigt. Hierdurch wurde der Bereich der *Far-Outer-Cleft* geschlossen (Abbildung 30 B), wodurch die Annäherung der *Strut*-Schleife zur *Relay*-Helix resultierte. Die Position des Inhibitors begünstigte die LYS600-GLU482-Interaktion zusätzlich, da diese innerhalb der MD-Simulationen in Anwesenheit eines Inhibitors bestehen blieb (Diagramm 3). Im Vergleichsexperiment mit der abweichenden

Position des Biaryls **36** wurde der stabilisierende Effekt seitens der Biaryle auf die LYS600-GLU482-Wechselwirkung bestätigt. Hier wurde die Interaktion des LYS600 mit der *Relay*-Helix genau wie in den Kontrolleexperimenten mit Nukleotid (ADP+Pi) in Abwesenheit des Inhibitors unterbrochen, wodurch die Interaktion des GLN644 mit dem LYS274 zustande kommen konnte.



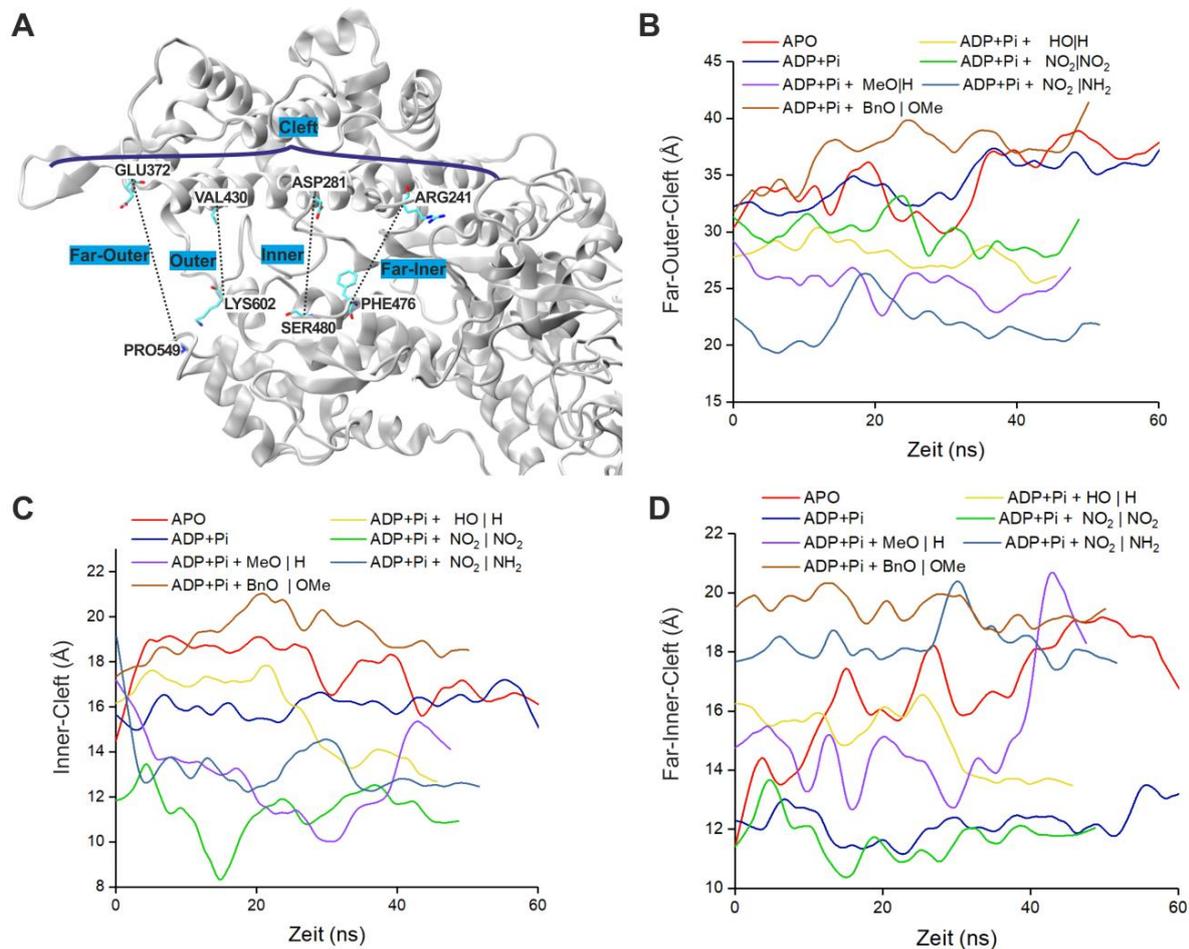
**Diagramm 3: Verlauf der Interaktion zwischen LYS600 und GLU482 in unterschiedlichen MD-Simulationen in An- und Abwesenheit der Inhibitormoleküle.** Die Aminosäuren LYS600 und GLU482 zeigen eine hohe Flexibilität im ADP+P<sub>i</sub>-gebundenem und im apo-Zustand des Proteins (ADP+P<sub>i</sub>: rot; APO: dunkelblau). Alle Inhibitoren mit der als Standard identifizierten Positionierung in der allosterischen Tasche des Myosin A verstärken den Kontakt zwischen LYS600 und GLU482 (**7** (H|H): gelb; **17** (Me|MeO): grau; **27** (OBn|MeO): magenta; **38** (NO<sub>2</sub>|NO<sub>2</sub>): grün; **36** (NO<sub>2</sub>|OH in abweichender Position): violett).

#### 4.6.3 Bereiche der *Cleft* in Protein-Biaryl-Komplexen

Der Effekt der biarylischen Inhibitoren auf die intramolekularen Vorgänge vom Myosin A wurde durch die Ausmessung der unterschiedlichen Bereiche der *Cleft* weiter untersucht (Abbildung 30). Nach Yang *et al.* kann die *Cleft* der Myosine in vier Bereiche aufgeteilt werden, die als *Far-Outer*, *Outer*, *Inner* und *Far-Inner Cleft* bezeichnet werden<sup>111</sup> (Abbildung 30 A). Die *Cleft*-Bereiche zeigten in Anwesenheit des jeweiligen Inhibitors ebenfalls ein Verhalten, welches von dem Nukleotid- und Inhibitor-freiem Zustand und des Proteins im Komplex mit hydrolysiertem Nukleotid (ADP+P<sub>i</sub>) ohne Inhibitor abwich (Abbildung 30 B, C, D).

Der Bereich der *Far-Outer-Cleft*, der in den Simulationen ohne Inhibitor stärker geöffnet wurde, wurde in Anwesenheit des Inhibitors zusammengezogen und zeigte geringere Fluktuation (Abbildung 30 B). In Anwesenheit des vergleichsweise größeren benzylierten Inhibitors **27** wurde der Bereich hingegen geöffnet (Abbildung 30 B). Im Bereich der *Outer-Cleft*, der in der direkten Nähe zur Bindestelle des Inhibitors

liegt, wurden keine Abweichungen im Vergleich zu den Simulationen ohne Inhibitor festgestellt.

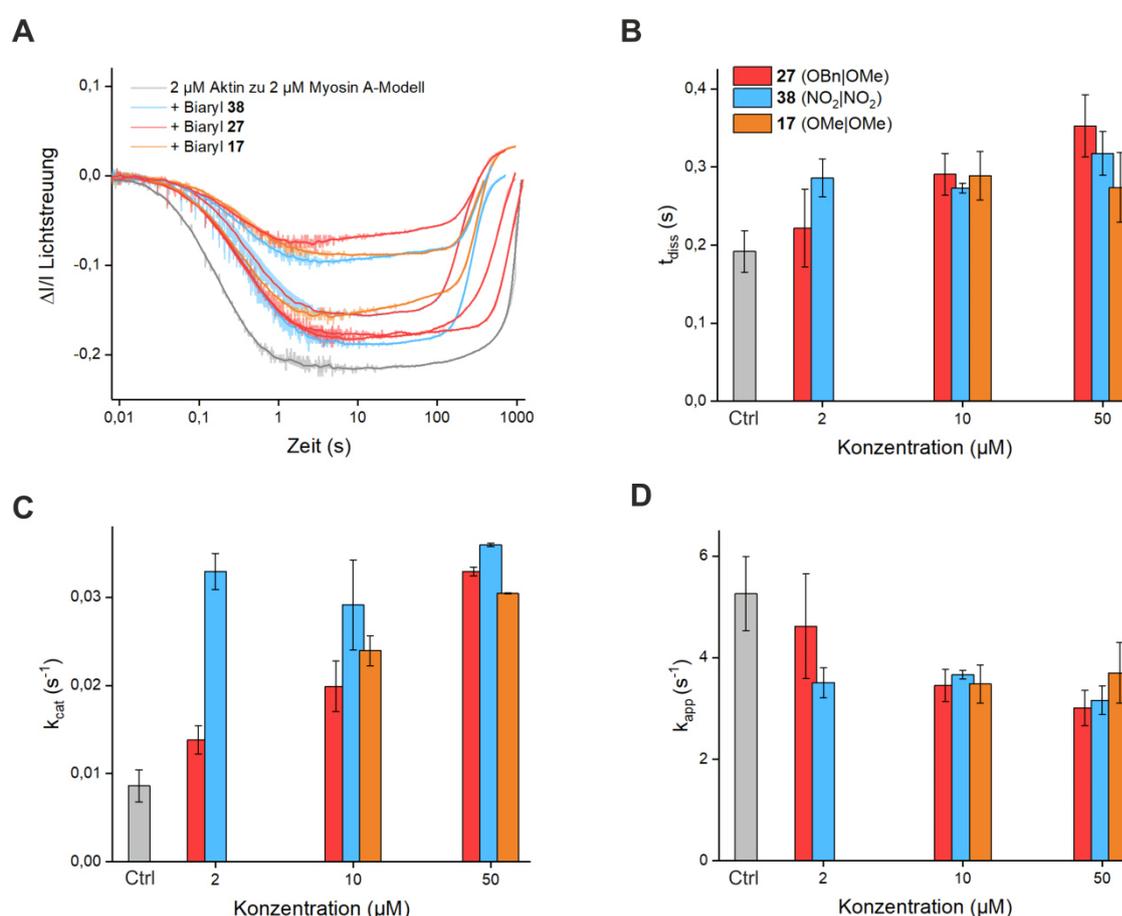


**Abbildung 30: Unterscheidung der Bereiche der Cleft in den Myosinen.** **A)** Die Bereiche von links nach rechts: *Far-Outer-Cleft* (gemessen zwischen den  $\alpha$ -C-Atomen der E372 und P549), *Outer-Cleft* (gemessen zwischen  $\alpha$ -C-Atomen der V430 und N602), *Inner-Cleft* (gemessen zwischen  $\alpha$ -C-Atomen der D281 und S480) und *Far-Iner-Cleft* (gemessen zwischen  $\alpha$ -C-Atomen der R241 und F476). **B, C und D)** Ergebnisse der Messungen von Bereichen der *Cleft* *Far-Outer*, *Inner* und *Far-Iner* innerhalb der 50 ns bis 60 ns MD-Simulationen. Bei der jeweiligen Messung wurden die Simulationen des Proteins in Abwesenheit des Inhibitors, im apo-Zustand (rot), sowie mit ADP+P<sub>i</sub> und Mg in der Nukleotidbindestelle (dunkel blau) durchgeführt. Die MD-Simulationen mit Inhibitoren wurden mit ADP+P<sub>i</sub> und Mg durchgeführt: 19 (violett), 23 (gelb), 38 (grün), 35 (hell blau), 27 (braun). Der Bereich der *Outer-Cleft* wurde ausgelassen, da in allen Zuständen keine Abweichungen auftraten.

Der Bereich der *Inner-Cleft* wurde durch die meisten Inhibitoren nach dem Erreichen der optimalen Ausrichtung zusammengezogen (Abbildung 30 C). Im Inhibitor-freien Zustand wurden die Abstände im Laufe der Simulation vergrößert und erneut bis zum Initialzustand verringert. Die Messungen der *Far-Iner-Cleft* ergaben ebenfalls ein eher stabiles Verhalten in allen Simulationen. Abweichungen traten in den Fällen der Inhibitoren, die deren optimale Position erst in den späteren Sequenzen der Simulationen erreichten (Abbildung 30 D).

#### 4.6.4 ATP-induzierte Dissoziation des Akto-Myosin-Komplexes

Die ATP-induzierte Dissoziation des Akto-Myosin-Komplexes wurde in den Flashphotolyse-Experimenten mit dem Myosin A-Modell in Anwesenheit der Biaryle untersucht, um weitere Hinweise zum Hintergrund der inhibitorischen Wirkung der Biaryle zu gewinnen. Mithilfe eines Laserpulses (*Flash*) wird das ATP aus einem UV-sensitiven Nitrophenylderivat des Adenosintriphosphats freigesetzt und vom Myosin gebunden<sup>112</sup>. ATP-Bindung verursacht eine schnelle und unumkehrbare Dissoziation des Akto-Myosin-Komplexes. Nach der vollständigen Hydrolyse des ATP wird der Komplex erneut aufgebaut. Dieser Prozess wurde in zeitaufgelöster Weise im Flashphotolyse-Experiment verfolgt<sup>113</sup> (Abbildung 31 A).

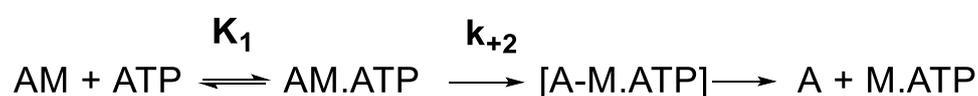


**Abbildung 31: ATP-induzierte Dissoziation des Akto-Myosin-Komplexes in Flashphotolyse-Experimenten.** **A)** Verlauf der Lichtstreuung im Flashphotolyse-Experiment. Das Myosin:Aktin-Verhältnis wurde bei 1:1 (jeweils 2  $\mu\text{M}$ ) konstant gehalten. Die Biaryle 27 (rot) und 38 (blau) wurde in den Konzentrationen 2  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  hinzugefügt. Der Effekt des Biaryls 17 (orange) wurde in den Konzentrationen 10  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  untersucht. Die Amplitude der Dissoziation-bedingten Signaländerung wird mit der Zunahme an Konzentration des jeweiligen Biaryls verringert. Die Zeit der Komplezwiederherstellung wird ebenfalls in Anwesenheit der Biaryle verkürzt. **B)** Diagramm der Dissoziationszeit des Akto-Myosin-Komplexes. Biaryle zeigen einen inhibitorischen Effekt auf die Dissoziation des Komplexes:  $t_{\text{diss}}$ (Ctrl; grau) =  $0.19 \pm 0.02$  s;  $t_{\text{diss}}$ (50  $\mu\text{M}$  27; rot) =  $0.35 \pm 0.03$  s;  $t_{\text{diss}}$ (50  $\mu\text{M}$  38; blau) =  $0.32 \pm 0.02$  s;  $t_{\text{diss}}$ (50  $\mu\text{M}$  17; orange) =  $0.27 \pm 0.04$  s. **C)** Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit ( $k_{\text{cat}}$ ) des ATP von der Konzentration der Biaryle. Die Biaryle beschleunigen den Hydrolyseprozess:  $k_{\text{cat}}$ (Ctrl; grau) =  $0.008 \pm 0.001$  s<sup>-1</sup>;  $k_{\text{cat}}$ (50  $\mu\text{M}$  27; rot) =  $0.033 \pm 0.0004$  s<sup>-1</sup>;  $k_{\text{cat}}$ (50  $\mu\text{M}$  38; blau) =  $0.036 \pm 0.0002$  s<sup>-1</sup>;  $k_{\text{cat}}$ (50  $\mu\text{M}$  17; orange) =  $0.032 \pm 0.0004$  s<sup>-1</sup>. **D)** Abhängigkeit der ATP-Affinität des Myosins ( $k_{\text{app}}$ ) von der Konzentration der Biaryle. Die Biaryle verringern die Affinität zum ATP:  $k_{\text{app}}$ (Ctrl; grau) =  $5.26 \pm 0.7$  s<sup>-1</sup>;  $k_{\text{app}}$ (50  $\mu\text{M}$  27; rot) =  $3.00 \pm 0.35$  s<sup>-1</sup>;  $k_{\text{app}}$ (50  $\mu\text{M}$  38; blau) =  $3.16 \pm 0.27$  s<sup>-1</sup>;  $k_{\text{app}}$ (50  $\mu\text{M}$  17; orange) =  $3.70 \pm 0.6$  s<sup>-1</sup>.

Biaryle **17**, **27** und **38**, die in den Flashphotolyse-Experimenten in Konzentrationen von 2  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  getestet wurden, zeigten einen inhibierenden Effekt auf die Dissoziation des Akto-Myosin-Komplexes (Abbildung 31 B). Die Dissoziationszeit des Kontrollexperimentes ohne Inhibitor wurde in den Experimenten mit Inhibitoren in der höchsten getesteten Konzentration im mittleren um den Faktor 1.5 erhöht (von  $t_{\text{diss}}=0.19$  s auf  $t_{\text{diss}}=0.31$  s). Für das Biaryl **38** war der maximale Effekt bereits ab der Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  erreicht, während das Biaryl **24** bei der gleichen Konzentration einen geringeren Effekt als bei der höchsten getesteten Konzentration aufwies ( $t_{\text{diss}}(2 \mu\text{M}) = 0.22$  s vs.  $t_{\text{diss}}(50 \mu\text{M}) = 0,35$  s). Das Biaryl **17** wurde nur in Konzentrationen 10  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  getestet. Für beide Konzentrationen wurde die gleiche Verlängerung der Dissoziationszeit um den Faktor 1.5 festgestellt (Abbildung 31 B). Mit der steigenden Konzentration wurde ebenfalls die Amplitude der Dissoziationsbedingten Signaländerung verringert (Abbildung 31 A). Weiss *et al.* zeigten in ihren Experimenten, dass die Veränderung der Signalamplitude in einem direkten Zusammenhang mit der Konzentration des vom Aktin abgelösten Proteins steht<sup>113</sup>.

Die Zeit für die vollständige Hydrolyse des freigesetzten ATP ( $t_{\text{cat}}$ ) wurde ab dem Zeitpunkt der zu 50% erfolgten Dissoziation bis 50% der Wiederherstellung des Akto-Myosin-Komplexes abgeschätzt. Das  $t_{\text{cat}}$  stellt den Reziproken Wert der Geschwindigkeitskonstante der ATP-Hydrolyse ( $k_{\text{cat}}$ ) dar. Der Wert der Konstante des Myosin A-Modells betrug in den Experimenten ohne Inhibitormoleküle  $0,0086 \text{ s}^{-1}$ . Durch die Verwendung der Biaryle **17**, **27** und **38** in maximaler getesteter Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  wurde der  $k_{\text{cat}}$ -Wert vervierfacht und betrug im mittleren  $0.033 \text{ s}^{-1}$  (Abbildung 31 C).

Die Kinetik der Akto-Myosin-Dissoziation kann nach Weiss *et al.* wie im Schema 15 beschrieben werden<sup>113</sup>.



**Schema 15: Kinetisches Modell der Akto-Myosin-Dissoziation nach Weiss *et al.*<sup>113</sup>.** A = Aktin, M = Myosin, A.M.ADP = Akto-Myosin-Komplex mit gebundenem ADP,  $K_{\text{AD}}$  = Dissoziationskonstante des A.M.ADP-Komplexes, AM.ATP = Produkt der ATP-Bindung an das Akto-Myosin-Komplex,  $K_1$  = Gleichgewichtskonstante der ATP-Bindung an das Akto-Myosin-Komplex, [A-M.ATP] = Übergangszustand mit schwacher Bindung zwischen Myosin und Aktin,  $k_{+2}$  = Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation.

Demnach handelt es sich beim dem Dissoziationsprozess um eine Reaktion der zweiten Ordnung. Die Gleichgewichtskonstante  $K_1$  und die Geschwindigkeitskonstante  $k_{+2}$  können allerdings zur Konstante  $k_{\text{app}}$  (*apparent*) zusammengefasst werden.

Diese Konstante erlaubt eine Quantifizierung der Bindungsaffinität des Proteins zum Nukleotid durch die Formel Formel 6.

$$k_{app} = \frac{1}{t_{diss}[ATP]} \quad \text{Formel 6}$$

$k_{app}$  betrug in Abwesenheit der biarylischen Inhibitoren  $5.26 \text{ s}^{-1}$ . Die getesteten Biaryle **17**, **27** und **38** setzten diesen Wert bei den höchsten eingesetzten Konzentrationen ( $50 \text{ }\mu\text{M}$ ) bis  $3.16 \text{ s}^{-1}$  herab (Abbildung 31 D). Dies entspricht einer 1.5-fachen Verringerung der Bindeaffinität des Myosin A-Modells zum ATP in Anwesenheit von biarylischen Inhibitoren.

#### 4.7 Strukturbasierter Ansatz zur Aufklärung der Selektivität von DBC

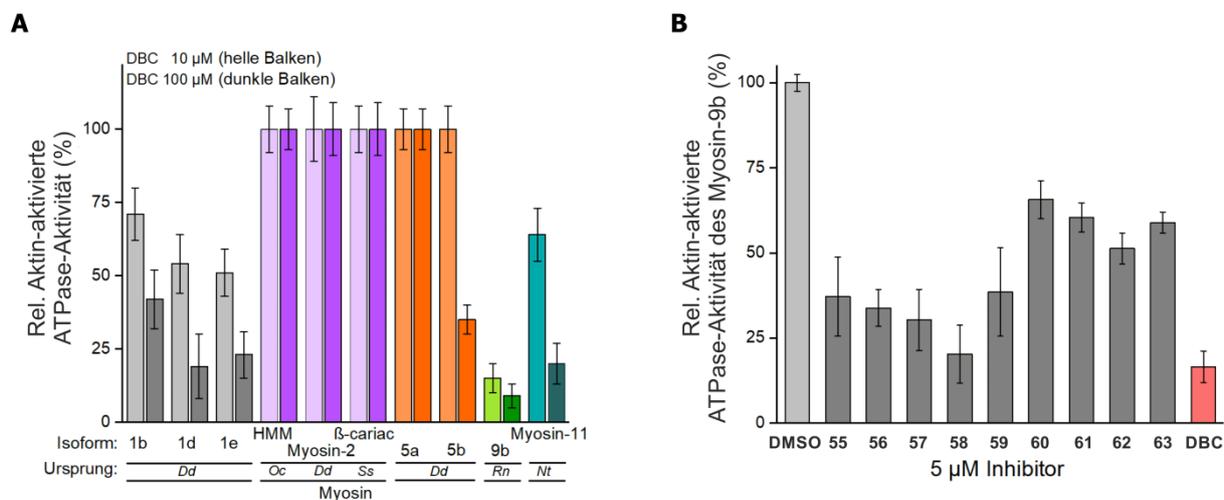
Der strukturbasierte Ansatz wurde in der vorliegenden Arbeit zur Verbesserung der inhibitorischen Wirksamkeit der Verbindungen mit einem biarylische Grundgerüst angewendet. Die aus den *in silico* Experimenten abgeleiteten *ortho*-Funktionalisierungen brachten eine Erhöhung des inhibitorischen Effektes gegenüber dem Myosin A-Modell, wobei der Effekt ebenfalls am Parasiten demonstriert werden konnte. Ebenfalls wurden aus dem strukturbasierten Ansatz nützliche Hinweise bezüglich des Hintergrundes der inhibitorischen Wirkung der Biaryle abgeleitet und durch die Flashphotolyse bestätigt. Im Weiteren wird der Ansatz zur Aufklärung des erhöhten Effektes des 3,6-dibromo-1-(hydroxymethyl)carbazols (DBC, **54**) auf die ATPase-Aktivität des *RnMyosin-9b* angewendet. Die selektive Inhibierung wurde in den Studien der Gruppe um Prof. Tsiavalariis festgestellt<sup>114</sup>. Das Myosin wird mit ösophagealem Adenokarzinom und Lungenkrebsprogression sowie mit Metastasierung vom Krebs in Verbindung gebracht, weshalb das DBC als spezifischer Myosin-9b-Inhibitor einen nützlichen Modulator der Tumorproliferation für zellulären Experimente und Krebsmodelle darstellen kann.

DBC inhibierte die ATPase-Aktivität des *RnMyosin-9b* im niedermolaren Konzentrationsbereich ( $\text{IC}_{50} = 2.5 \text{ }\mu\text{M}$ ), während die Aktivität mehrerer Isoformen der Motorproteine von Klassen 1, 2 und 5 entweder uneingeschränkt blieb oder nur zu einem relativ niedrigen Ausmaß beeinflusst oder wurde nur von höheren Konzentrationen des Inhibitors effektiv gehemmt wurde (Tabelle 20, Abbildung 32).

**Tabelle 20: Das Substitutionsmuster des Carbazolgrundkörpers und die Liste der halogenierten Carbazolderivate.**

N	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>	R <sup>7</sup>	R <sup>8</sup>
55	OMe	H	F	F	H	F	H	H
56	OH	H	F	F	H	F	H	H
57	OMe	H	Cl	Cl	H	Cl	H	H
58 (DMC)	OH	H	Br	Br	H	Me	H	H
59	COOH	H	Br	H	H	Br	H	H
60	COOMe	H	Br	H	H	Br	H	H
54 (DBC)	CH <sub>2</sub> OH	H	Br	H	H	Br	H	H
61	OMe	H	F	H	H	F	H	H
62	OH	H	F	H	H	F	H	H
63	OH	H	F	H	H	H	H	H

N=Nummerierung der Verbindung; R<sup>1-8</sup>=Substituenten



**Abbildung 32: Effekt der Carbazolderivate auf die ATPase-Aktivität der Myosine.** A) Inhibierung der Aktin-aktivierten ATPase Aktivität unterschiedlicher Myosine durch DBC. Myosin-1b, -1d, -1e (grau), SkHMM, *Dd*Myosin-2, β-kardiales Myosin-2 (violett), *Dd*Myosin-5a, -5b (orange), *Ce*Myosin-9b (grün), *Nt*Myosin-11 (cyan). Konzentrationen des DBC: 10 μM (helle Balken) und 100 μM (dunkle Balken). B) Inhibierende Wirkung unterschiedlicher Inhibitoren (Konzentration 5 μM) auf die Aktin-aktivierten ATPase Aktivität des Myosin-9b. Die Kontrollprobe mit DMSO und DBC sind jeweils als hellgrauer und roter Balken dargestellt. Die Ergebnisse stammen aus den Studien Tsiavalariis *et al*<sup>114</sup>.

Die Studie der Struktur-Aktivitätsbeziehung unter Verwendung von Carbazolderivaten **54-63** deuteten auf eine signifikante Rolle der Hydroxy- bzw. der Methylhydroxyfunktion in der C-1-Position der Leitstruktur, sowie auf die Besetzung der C-3-Position mit einem Halogenatom hin, der ein höheres Polarisationspotential aufweist. Ebenfalls ist die Anwesenheit einer sterisch größeren Funktion wie einer Methylgrup-

pe in der Position C-6 von Bedeutung (Tabelle 20 und Abbildung 32). In den folgenden Kapiteln werden die Erkenntnisse der *in silico*-Untersuchungen bezüglich der Aktivitäten des DBC und eines weiteren aktiven Carbazolderivates **58 (DMC)** gegenüber dem *RnMyosin-9b* beschrieben.

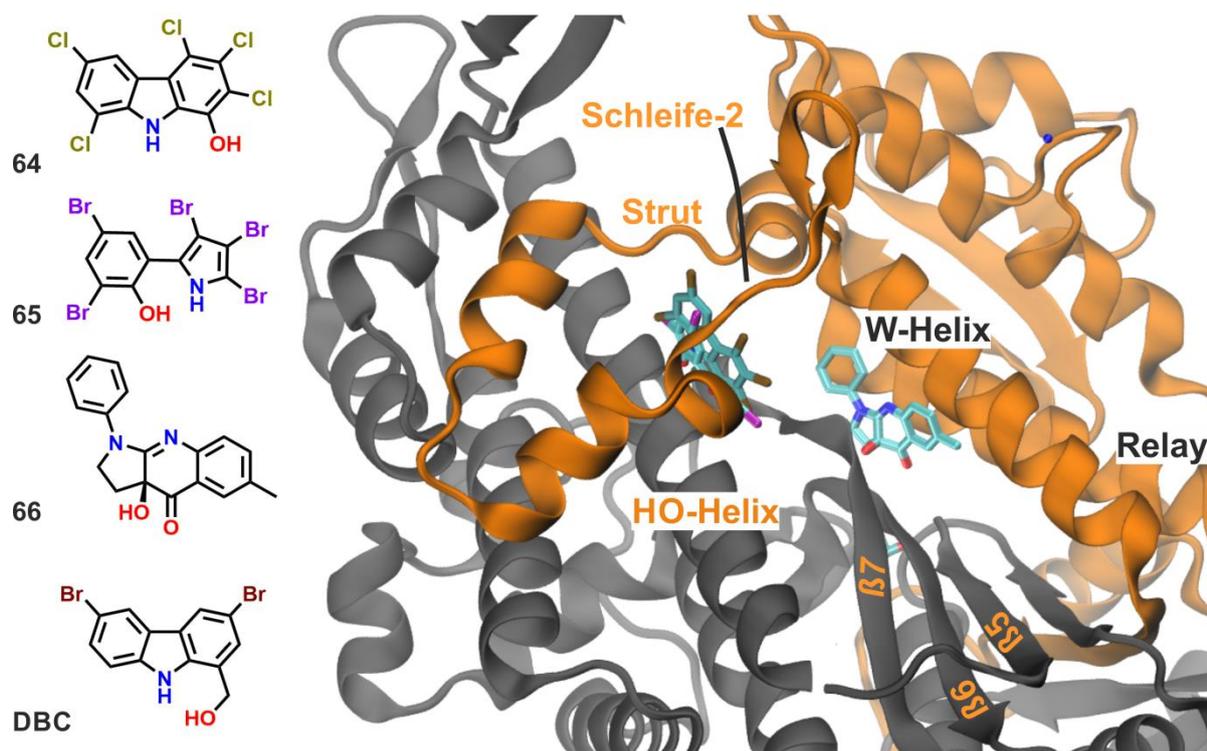
#### 4.7.1 Ensemble-basiertes molekulares Docking

Der Effekt von DBC gegenüber *RnMyosin-9b* wurde mithilfe des molekularen Dockings untersucht. Die Position des DBC im Myosin-9b wurde mit den röntgenkristallographischen Strukturen der Myosinklassen 1, 2, 5, in den *pre-power-stroke* und *postrigor* Zuständen, sowie den Homologiemodellen des Myosin-1 im *postrigor* Zustand und des Myosin-9b in beiden Zuständen ermittelt (Tabelle 21).

**Tabelle 21: Übersicht der verwendeten Proteinstrukturen.**

Myosinklasse	Pre-power-stroke (PDB)	Postrigor (PDB)
1	1LKX	Homologiemodell
2	2JJ9	1MMD
5	4ZG4	1W7J
9	Homologiemodell	Homologiemodell

Der abgesuchte Bereich des Proteins wurde basierend auf den kristallographisch ermittelten Positionen der Inhibitoren mit den verwandten Basisstrukturen wie der des Carbazols **64** (PDB:2X9H<sup>115</sup>) und des Pseudilins **65** (PDB:2JHR<sup>89</sup>), die beide ein pentahalogeniertes Grundgerüst aufweisen, sowie der des Pyrrolochinolin **66** (PDB:1YV3<sup>116</sup>) auf den *Cleft*-Bereich expandiert (Abbildung 33).



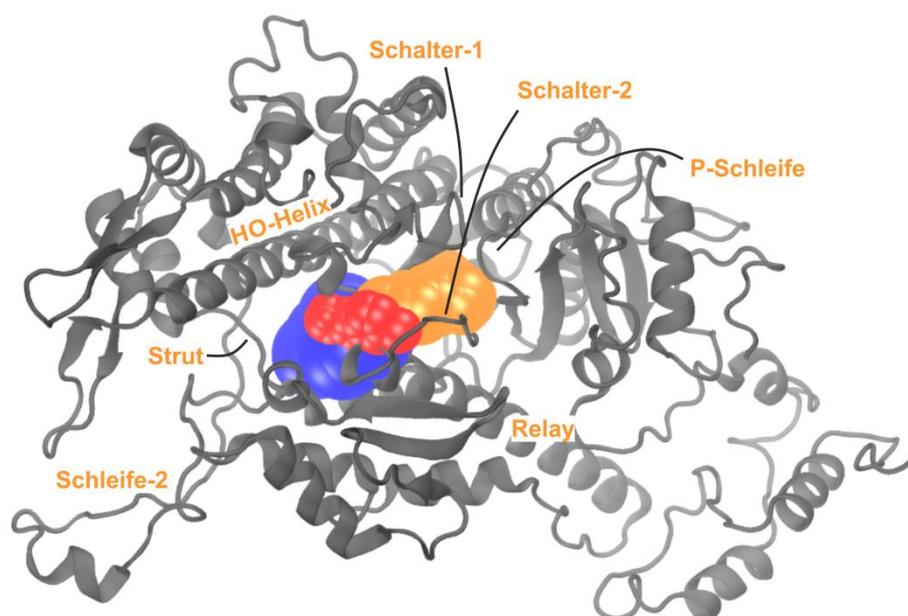
**Abbildung 33:** Kristallstruktur des Myosin-2<sup>116</sup> und die Positionen der charakterisierten Inhibitoren 2,3,4,6,8-Hydroxycarbazol (64), Pentabromopseudilin (65)<sup>117</sup>, Blebbistatin (66)<sup>116</sup>. Die Inhibitoren 64, 65, 66 und DBC weisen strukturelle Gemeinsamkeiten auf. Die kristallographisch bestimmte Position der Inhibitoren 64 und 65 wird durch HO-Helix, Schleife-2 und *Strut*-Schleife definiert. Die Position des Blebbistatin (66) ist im Bereich der *Relay*-Helix, sowie der  $\beta$ 7- und  $\beta$ 6-Faltblätter lokalisiert.

Die Dockingexperimente ermöglichten keine plausible Erklärung der inhibitorischen Aktivität. Um die Dynamik der Proteine zu berücksichtigen und somit die eventuell verschlossenen allosterischen Bereiche der Myosine in die Kalkulationen einzuschließen, wurde der Dockingansatz durch eine Ensemble-basierte Methode erweitert<sup>118</sup>. Mit jeder Proteinstruktur wurden dafür MD-Simulationen (Länge 50 ns) durchgeführt. Aus diesen wurden anhand der RMSD-Ähnlichkeit im CHIMERA Strukturcluster abgeleitet, die für das jeweilige Protein ein Strukturensemble von 50 Repräsentativstrukturen lieferten. Zur Quantifizierung der geometrischen Veränderungen in den allosterischen Bereichen der *Cleft*, wurde das Volumen des jeweiligen Bereiches mit POVME<sup>119</sup> bestimmt (7.2). Die Ermittlungen ergaben hochdynamische Veränderungen der allosterischen Bereiche und spiegelten die Unterschiede zu den Initialstrukturen wieder. Ebenfalls wurde im Myosin-9b ein zuvor nicht identifizierbarer Bereich in der Nähe der Nukleotidbindestelle erkannt. Dieser ist zwischen Schlater-1 und -2 lokalisiert und wurde innerhalb dieser Studie als Tasche-2 bezeichnet (Abbildung 34). Tasche-2 ist über den hier als Tunnel definierten Bereich zwischen *Relay*-Helix und  $\beta$ 7-Schleife mit der ursprünglich verwendeten allosterischen Tasche um den Bindebereich des Pentabromopseudilins (Tasche-1) verbunden (Abbildung 34). Der Bereich der Tasche-2 weist eine hohe sequentielle Ähnlichkeit unter den

innerhalb der Studie verwendeten Myosinen (Tabelle 22). Die Volumenveränderungen innerhalb der MD-Simulationen spiegeln dennoch ein hochdynamisches Verhalten des Bereiches im Myosin-9b wieder. Das Volumen der Tasche in den *pre-power-stroke* und *post-rigor* Zuständen der Homologiemodelle von *RnMyosin-9b* variierte innerhalb der MD-Simulationen von  $20 \text{ \AA}^3$  bis  $50 \text{ \AA}^3$ , während das Volumen der Tasche in den Proteinen der Klassen 1, 2 und 5 weitaus geringere Veränderungen aufwies (7.2).

**Tabelle 22: Sequenzieller Vergleich der Taschen 1 und 2 in den unterschiedlichen Motorproteinen.**

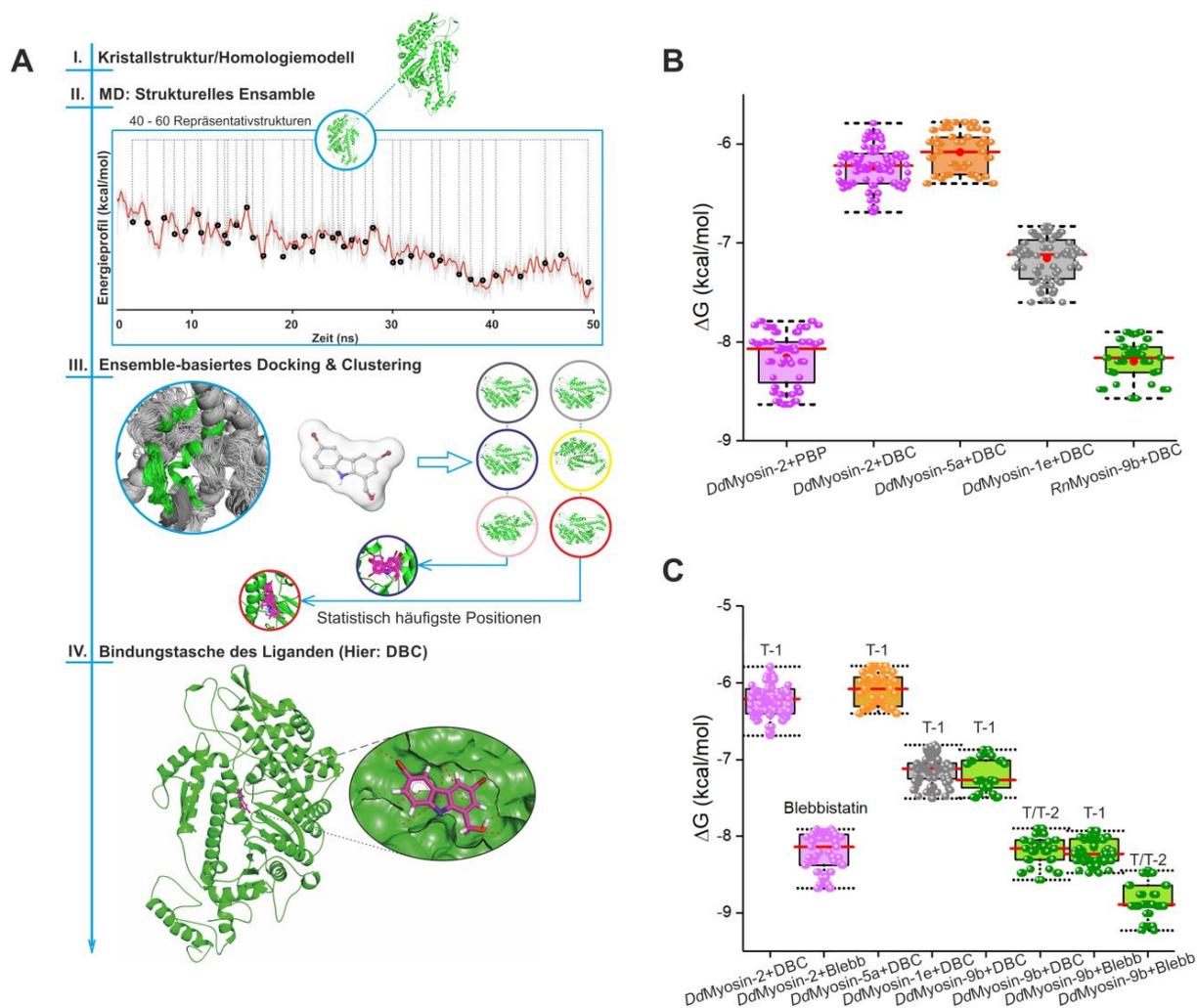
Ähnlichkeit mit Myosin-9	Tasche-1 (%)	Tasche-2 (%)
Myosin-1	69	86
Myosin-2	59	92
Myosin-5	56	89



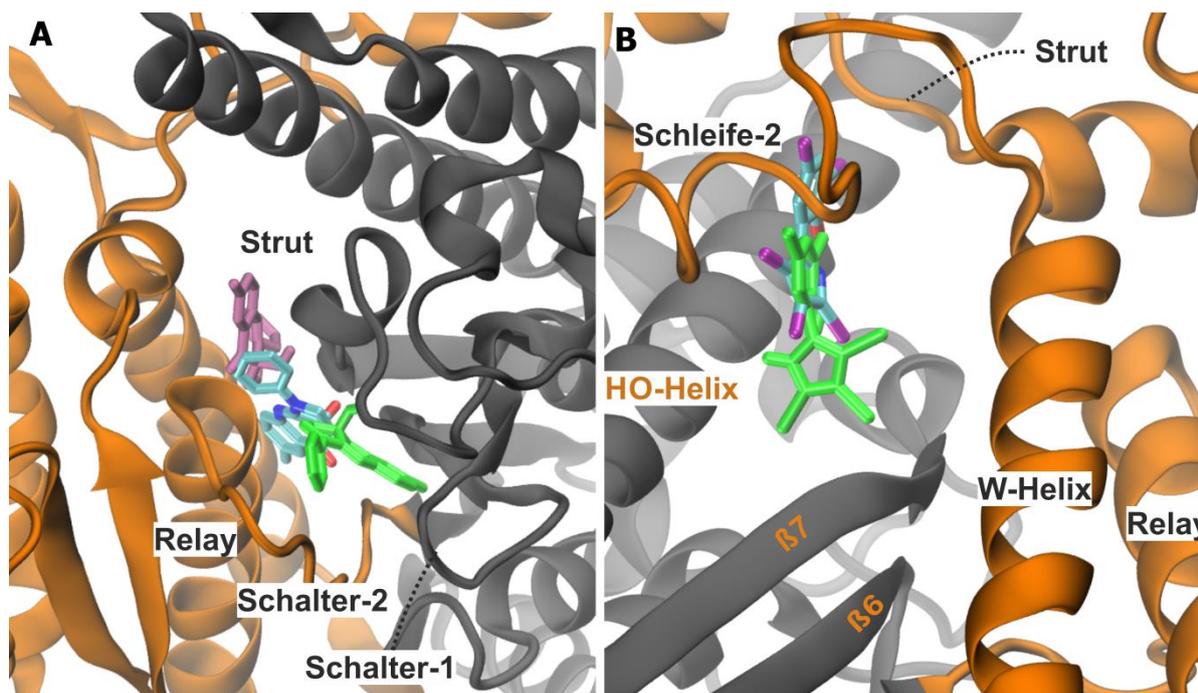
**Abbildung 34: Das Homologiemodell des Myosin-9b mit den potentiellen Bindetaschen in der Cleft.** Tasche-1 (blau), Tunnel (rot) und Tasche-2 (orange). Tasche-1 wird durch HO-Helix, Strut, Schleife-2,  $\beta$ 7-Schleife und  $\beta$ 7-Strang definiert. Tunnel begrenzen die Relay- und HO-Helices, Schalter-1 und -2 und  $\beta$ 7-Schleife. Tasche-2 wird durch die Schalter-1 und -2, sowie  $\beta$ 6-Strang und Teile der P-Schleife beschränkt.

Die Dockingexperimente wurden mit den Repräsentativstrukturen unter Ausweitung des Dockingbereiches von Tasche-1 auf die Bereiche des Tunnels und der Tasche-2 wiederholt. Die RMSD-basierte Clusteringanalyse der Ligandposition, sowie der dazugehörigen Interaktionsenergie ergab eine Tendenz zur jeweiligen Inhibitorposition in der allosterischen Tasche der Myosine (Abbildung 35 A und B). Die erhaltenen Werte korrelierten mit der experimentell ermittelten *in vitro* Effektivität des Inhibitors DBC gegenüber den Motordomänen der Myosine 1, 2, 5 und 9. Die häufigste und

energetisch günstigste Position des DBC im Myosin-9b wurde im Bereich zwischen Tunnel und Tasche-2 in der Nähe der Blebbistatintasche ermittelt (Abbildung 35). Die ermittelte Position des DBC wurde unter Verwendung von Blebbistatin (**66**) und Pentabromopseudilin (**65**) verifiziert. Für Blebbistatin wurde in der *in vitro* Studie ebenfalls ein hoher Effekt auf das *Rn*Myosin-9b in einer Konzentration von 10  $\mu$ M ermittelt. Der Effekt war mit dem des DBC vergleichbar<sup>114</sup>. Zunächst wurden die bevorzugten Positionen des Blebbistatin (**66**), sowie des Pentabromopseudilins (**65**) im Myosin-2 mithilfe des Ensemble-basierten Dockings ermittelt (Abbildung 35 B und C). Die häufigsten und energetisch günstigsten Positionen der beiden Inhibitoren stimmten mit deren Positionen innerhalb der Kristallstrukturen mit vernachlässigbaren Abweichungen überein (Abbildung 36). Die mittleren  $\Delta G$ -Werte betragen entsprechend -8.14 kcal/mol und -8.05 kcal/mol (Abbildung 35 B und C). Eine gute Übereinstimmung der kalkulierten Positionen mit den Positionen in den Kristallstrukturen liefert einen energetischen Referenzwert für stabile Interaktionen der Inhibitoren um den Wert von  $\Delta G = -8$  kcal/mol.



**Abbildung 35: Ergebnisse des Ensemble-basierten Dockings.** **A)** Herangehensweise bei dem Ensemble-basierten Docking. Aus einer Kristallstruktur bzw. einem Homologiemodell des Proteins (I) wird mittels MD-Simulation (II) Ensemble aus Proteinstrukturen generiert (II). Dieses wird im Docking verwendet. Die resultierenden Positionen des Inhibitormoleküls werden anhand des RMSD geclustert. Die Cluster werden nach Häufigkeit verglichen, um die häufigsten Positionen auszumachen (III). Das energetisch günstigste Cluster ergibt die repräsentative Position des Inhibitors (IV). Die Energie wird aus dem Mittelwert der Konformationen des Clusters berechnet. **B)** Kalkulierten Gibbs-Energien innerhalb der strukturellen Ensembles der Myosine im Komplex mit DBC und Myosin-2-PBP-Komplex als Kontrolle. Die maximalen und minimalen Werte werden als gestrichelte Linie im Box-Plot gezeigt. Die unteren und oberen Boxgrenzen zeigen den interquartilen Bereich (*interquartile range* = IQR), der die Datenvarianz darstellt. Der mittlere Wert der jeweiligen Gibbs-Energie wird als der Mittelwert des Anteils von 50% der am häufigsten vertretenen Werte errechnet.  $\Delta G(\text{DdMyosin-2} + \text{PBP}) = -8.05 \pm 0.38$  kcal/mol (erste violette Box; Position: Tasche-1, Pseudilintasche);  $\Delta G(\text{DdMyosin-2}) = -6.24 \pm 0.34$  kcal/mol (zweite violette Box, Position: Tasche-1);  $\Delta G(\text{DdMyosin-5a}) = -6.2 \pm 0.57$  kcal/mol (orange Box; Position: Tasche-1);  $\Delta G(\text{DdMyosin-1e}) = -7.17 \pm 0.38$  kcal/mol (graue Box; Position: Tasche-1/Tunnel);  $\Delta G(\text{RnMyosin 9b}) = -8.21 \pm 0.21$  kcal/mol (grüne Box; Position: Tunnel/Tasche-2). **C)** Verifizierungsexperiment mit Blebbistatin.  $\Delta G(\text{DdMyosin-2} + \text{DBC}) = -6.24 \pm 0.34$  kcal/mol (erste violette Box; Position: Tasche-1 (T-1));  $\Delta G(\text{DdMyosin-2} + \text{Blebbistatin}) = -8.14 \pm 0.4$  kcal/mol (zweite violette Box; Position: Tasche-1 (T-1), nahe Blebbistatintasche);  $\Delta G(\text{DdMyosin-5a} + \text{DBC}) = -6.2 \pm 0.57$  kcal/mol (orange Box; Position: Tasche-1 (T-1));  $\Delta G(\text{DdMyosin-1e} + \text{DBC}) = -7.08 \pm 0.22$  kcal/mol (graue Box; Position: Tasche-1 (T-1));  $\Delta G(\text{RnMyosin-9b} + \text{DBC}) = -7.27 \pm 0.36$  kcal/mol (erste grüne Box; Position: Tasche-1 (T-1));  $\Delta G(\text{RnMyosin-9b} + \text{DBC}) = -8.21 \pm 0.21$  kcal/mol (zweite grüne Box; Position: Tunnel/Tasche-2 (T/T-2));  $\Delta G(\text{RnMyosin-9b} + \text{Blebbistatin}) = -8.23 \pm 0.28$  kcal/mol (dritte grüne Box; Position: Tasche-1, nahe Blebbistatintasche);  $\Delta G(\text{RnMyosin-9b} + \text{Blebbistatin}) = -8.84 \pm 0.3$  kcal/mol (vierte grüne Box; Position: Tunnel/Tasche-2 (T/T-2)).

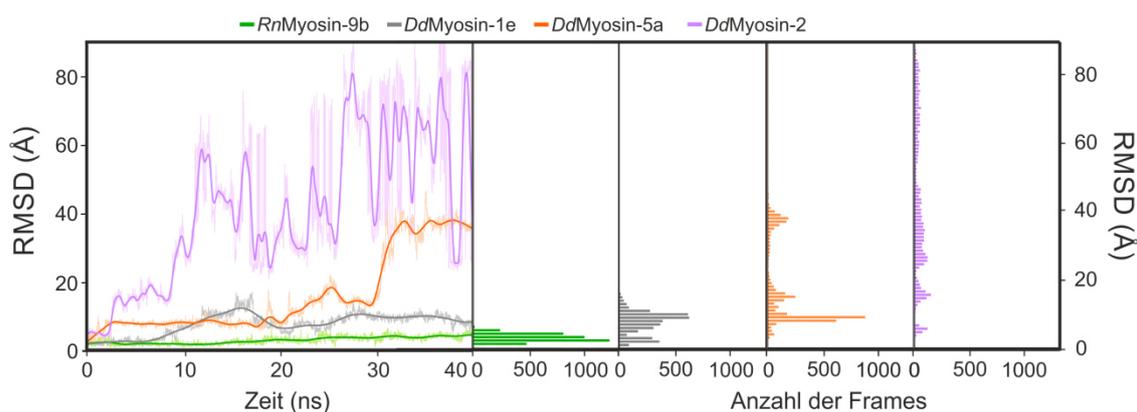


**Abbildung 36:** Vergleich der kristallographisch ermittelten Positionen von Blebbistatin (66, cyan)<sup>116</sup> und Pentabrompseudilin<sup>117</sup> (65, cyan) im Myosin-2 mit den Positionen der Inhibitoren, die innerhalb der Ensemble-basierten Dockingexperimente ermittelt wurden. **A)** Die zwei häufigste Positionen des Blebbistatin im Docking (magenta und grün). Die energetisch günstigste, häufigste Position im Bereich des Tunnels/Tasche-2 ( $\Delta G = -8.14 \pm 0.4$  kcal/mol; grün). Die zweitgünstigste Lage im Bereich der Tasche-1 (magenta). **B)** Die häufigste und energetisch günstigste Positionierung des PBP ( $\Delta G = -8.05 \pm 0.45$  kcal/mol; grün) weicht nur sehr wenig von der Position im Kristall (cyan) ab.

Die Struktur des Blebbistatin wurde ebenfalls im Komplex mit dem Ensemble des Myosin-9b verwendet. In den Dockingexperimenten wurden hierbei vergleichbar mit DBC zwei günstige Positionen gefunden (Abbildung 35 C). Die Positionen der Liganden folgten dem gleichen energetischen Trend. Die energetisch zweitgünstigsten Positionen des DBC und Blebbistatin wurden in der Tasche-1, am  $\beta 7$ -Strang in der Nähe der Bindetasche des Blebbistatin ermittelt. Die energetisch günstigsten Positionen waren in beiden Fällen im Zwischenbereich des Tunnels und der Tasche-2 lokalisiert (Abbildung 36 A). Die Differenz der ermittelten Gibbs-Energien zwischen den zwei besten Positionen betrug in beiden Fällen 0.5 bis 1 kcal/mol (Abbildung 35 C).

Die gefundenen günstigsten Position des DBC im Myosin-9b wurden durch MD-Simulationen unter Verwendung der energetischen Beschleunigung validiert<sup>101</sup>. Es wurden alle am häufigsten gefundenen Positionen, sowie die Position des DBC in der Tasche-2 in der direkten Nähe zur Nukleotidbindestelle überprüft. Die höchste Stabilität der Interaktion wurde für die innerhalb der Dockings ermittelte energetisch günstigste Position des DBC bestätigt (Diagramm 4, grüner Graph und Balken). Der RMSD-Wert überstieg nicht den Wert von 3 Å. In allen anderen Positionen wies das Inhibitormolekül ein hohes Fluktuationsverhalten auf. Die Stabilität der Protein-

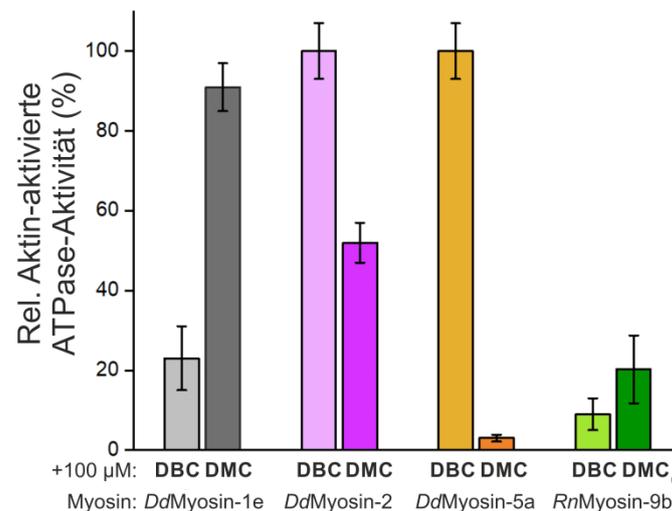
Inhibitor-Interaktionen in den häufigsten und energetisch bevorzugten Positionen des DBC in den Myosinen der Klassen 1, 2 und 5 war niedrig. Die Abweichungen der DBC-Position, die über den Verlauf des RMSD innerhalb der beschleunigten MD-Simulation ermittelt wurden, gehen für diese Protein-Inhibitor-Komplexe weit über 3 Å der stabilen Position des DBC im *RnMyosin-9b* hinaus. Die vergleichbare Lage des DBC wurde nur im Myosin-1 zu einem geringen Anteil populiert, während die Verteilung der Positionen in den Myosinen der Klasse 5 und 2 eine sehr breite Streuung aufwies (Diagramm 4).



**Diagramm 4: Verteilung der Positionen des DBC in den Myosinen 1, 2, 5 und 9 in den beschleunigten MD-Simulationen von 40 ns.** RMSD-Veränderung spiegelt die Veränderung der Ligandposition wieder. Die RMSD-Veränderung ab 4 Å deutet auf eine Verschiebung um etwa eine Moleküllänge. *RnMyosin-9b* – grün; *DdMyosin-1e* – grau; *DdMyosin-5a* – orange; *DdMyosin-2* – violett.

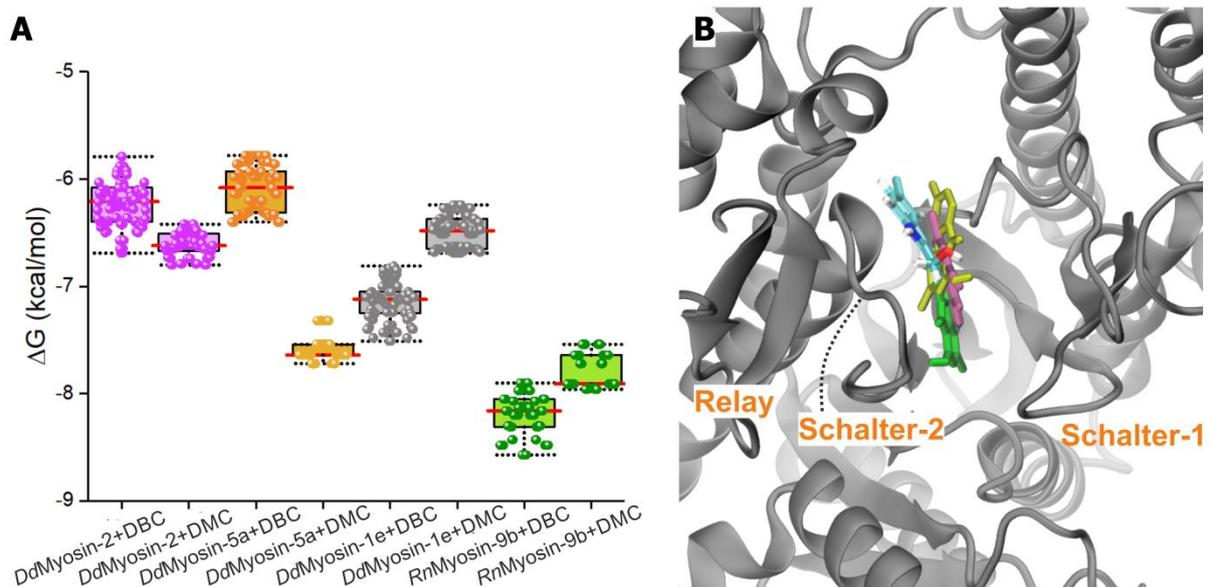
#### 4.7.2 Die inhibitorische Aktivität von DMC

In den *in vitro* Experimenten inhibierte ein weiteres Carbazolderivat 3,4-dibromo-6-methyl-1-hydroxycarbazol (**DMC, 58**) die ATPase-Aktivität des *RnMyosin-9b* mit einem vergleichbaren Effekt wie das DBC (Abbildung 32 B). Im Gegensatz zum DBC zeigte die Verbindung keine selektive Inhibierung des *RnMyosin-9b* bei höheren Konzentrationen von 100 µM (Diagramm 5). Die Substanz setzte außer der ATPase-Aktivität des *RnMyosin-9b* die Aktivität des *DdMyosin-5a* und des *DdMyosin-2* herab, die von DBC in diesem Konzentrationsbereich unbeeinflusst blieben (Abbildung 32 und Diagramm 5). Zur Untersuchung des Effektes seitens DMC gegenüber *RnMyosin-9b* wurde die gleiche Sequenz aus Ensemble-basierten Docking, gefolgt von der Validierung der erhaltenen Positionen im jeweiligen Protein über die beschleunigte MD-Simulation verwendet.



**Diagramm 5:** Effekt des DBC und des DMC bei der Konzentration von 100 µM auf die Aktin-aktivierte ATPase-Aktivität der Myosine der Klassen 1 (grau), 2 (violett), 5 (orange) und 9 (grün)<sup>14</sup>.

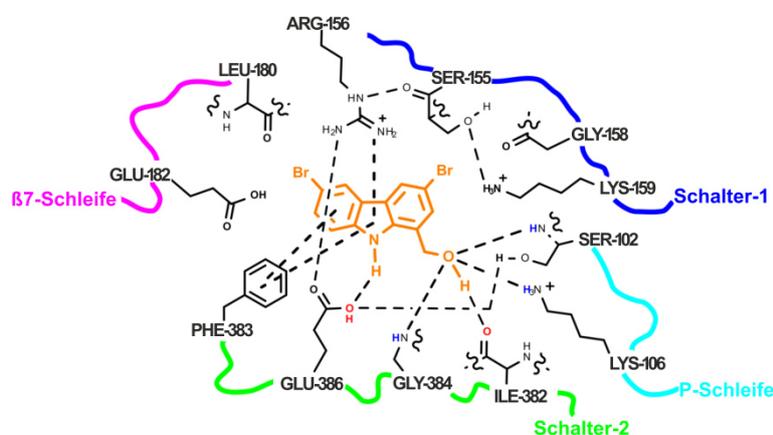
Durch die Ensemble-basierten Dockingexperimente wurde für das DMC in den Myosinen 2 und 5 die Position im Tunnelbereich als die mit der günstigsten Interaktionsenergie ermittelt. Die Population der Position wurde für das DBC in diesen Myosinen nicht beobachtet. Die Stabilitätstests über die beschleunigten Simulationen zeigten für die Position des DMC in den Myosinen 9 und 5 einen konstanten Verlauf, während die Position des Inhibitormoleküls im Myosin-2 fluktuierte (Abbildung 37).



**Abbildung 37:** Ergebnisse des Ensemble-basierten Dockings für das DMC mit Vergleich zu DBC. **A)** Boxplot-Diagramm der statistischen Auswertung der Dockingergebnisse. Für das jeweilige Myosin sind die Ergebnisse erst im Komplex mit **DBC** und nachfolgend mit **DMC** angegeben.  $\Delta G(\text{DdMyosin-2} + \text{DBC}) = -6.21 \pm 0.32$  (erste violette Box);  $\Delta G(\text{DdMyosin-2} + \text{DMC}) = -6.69 \pm 0.15$  (zweite violette Box);  $\Delta G(\text{DdMyosin-5a} + \text{DBC}) = -6.08 \pm 0.38$  (erste orange Box);  $\Delta G(\text{DdMyosin-5a} + \text{DMC}) = -7.64 \pm 0.18$  (zweite orange Box);  $\Delta G(\text{DdMyosin-1e} + \text{DBC}) = -7.12 \pm 0.2$  (erste graue Box);  $\Delta G(\text{DdMyosin-1e} + \text{DMC}) = -6.48 \pm 0.38$  (zweite graue Box);  $\Delta G(\text{RnMyosin-9b} + \text{DBC}) = -8.16 \pm 0.26$  (erste grüne Box);  $\Delta G(\text{RnMyosin-9b} + \text{DMC}) = -7.79 \pm 0.26$  (zweite grüne Box). **B)** Statistisch am höchsten populierte und energetisch günstigste Positionen des DMC in Myosinen der Klassen 2 (gelb), 5 (grün) und 9 (magenta) im Vergleich zu der stabilsten Position des DBC im Myosin-9b (cyan).

### 4.7.3 Wechselwirkungen von DBC und DMC mit *RnMyosin-9b*

Aus den Ensemble-basierten Dockingexperimenten und den beschleunigten MD-Simulationen wurde für beide Carbazole DBC und DMC eine Erkenntnis über deren potentielle Positionierung in den Myosinen der Klasse 9 und 5 im Bereich nahe der Bindestelle des Blebbistatin gewonnen (Abbildung 34 und Abbildung 37). In diesen Proteinen wurde die gefundene Position am höchsten populiert und stellte ebenfalls die energetisch günstigste Platzierung dar. In den Myosinen anderer Klassen, bei denen innerhalb der biologischen Experimente kein oder nur ein vernachlässigbar geringer inhibitorischer Effekt beobachtet wurde, wurde diese Positionierung des Liganden entweder nicht oder nur zu einem geringen Anteil bzw. mit vergleichsweise hohen  $\Delta G$ -Werten populiert. Die ermittelte allosterische Tasche wurde anhand der gefundenen und potentiellen Wechselwirkungen mit den Aminosäuren zwischen den Motorproteinen verglichen (Schema 16). Die höchste sequenzielle Homologie besteht mit dem entsprechenden Bereich des Myosin-1. Diese liegt bei 76%, während die Bereiche in den Myosinen 5 und 2 etwas geringere Homologie von jeweils 71% und 62% aufweisen (Schema 16).



Myosin-9: **SRF**(158-160)-**LLEKSR**(180-185)-**FG**(383-384)-**E**(386)-**R**(390)-**FEQFCI**(393-398)-**N**(512)-**V**(581)

Myosin-1: **SRF**(163-165)-**LLEKSR**(183-188)-**YG**(388-189)-**E**(391)-**N**(395)-**FEQLNI**(398-403)-**N**(523)-**F**(566)

Sequenzielle Ähnlichkeit: 76%

Myosin-2: **SRF**(237-239)-**LLEKSR**(262-267)-**SG**(456-457)-**E**(458)-**V**(463)-**FEQLCI**(466-471)-**N**(588)-**Y**(634)

Sequenzielle Ähnlichkeit: 62%

Myosin-5: **SRF**(216-218)-**LLEKSR**(241-246)-**YG**(437-438)-**E**(440)-**F**(442)-**FEQFCI**(447-452)-**N**(566)-**F**(628)

Sequenzielle Ähnlichkeit: 71%

**Schema 16: Wechselwirkungen des DBC innerhalb der ermittelten allosterischen Tasche des *RnMyosin-9b* und der Sequenzvergleich des Bereiches in den Myosinen 1, 2 und 5.** Im Wechselwirkungsschema sind alle Aminosäuren dargestellt, die in den Dockingexperimenten und den MD-Simulationen in der Wechselwirkung mit dem Liganden gefunden wurden. Bei dem Sequenzvergleich sind alle Aminosäuren in dem Umkreis von 4 Å um den Liganden berücksichtigt, die potentiellen Wechselwirkungen mit dem Liganden eingehen können. Die Aminosäuren sind durch Einbuchstabencode angegeben und farbig wie folgt gekennzeichnet: rot = gleiche Aminosäure, ähnliche Position; blau = unterschiedliche Aminosäure; gelb = Aminosäure, deren Positionen von der im Referenzprotein Myosin-9b stark abweicht oder die ein abweichendes Sekundärstrukturelement ausmacht.

Das hydrophobe PHE383 im Myosin-9, das eine potentielle Wechselwirkung mit dem aromatischen Grundgerüst des Carbazols eingehen kann, ist in den Myosinen 1, 5 und 2 jeweils durch Aminosäuren mit einer zusätzlichen Hydroxyfunktion (TYR388/437 und SER456) ersetzt. Durch die Hydroxyfunktion ist die Ausbildung von sowohl intermolekularen als auch intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen möglich, wodurch zum einen die Lage des Moleküls in der allosterischen Tasche und zum anderen die Zugänglichkeit der Tasche verändert werden kann. Das benachbarte Glycin ist zwar in allen Myosinen konserviert, war allerdings in den Myosinen 1, 2 und 5 in einer von der Myosin-9-Lage stark abweichende Positionierung gefunden (Schema 16). Dem basischen ARG390 im Schalter-2 des Myosin-9 entspricht im Myosin-1 das ebenfalls basische ASN395. In den Myosinen 2 und 5 sind hier die neutralen VAL463 und PHE442 platziert. Die Aminosäurefolge FEQFCI macht im Myosin-9 einen Teil der *Relay*-Helix und somit einen großen Teil des potentiellen Interaktionsbereiches mit dem DBC aus. Diese Folge weist in den Myosinen 1 und 2 Unterschiede auf. Im Myosin-1 wird der vollständig neutrale FC-Ausschnitt durch das basische ASN402 (LN) verändert. Im Myosin-2 befindet sich an der Stelle des hydrophoben PHE396 das ebenfalls hydrophobe, allerdings sterisch und elektronisch unterschiedliche LEU469. Die Aminosäurefolge im Myosin-5 ist mit der im Myosin-9 identisch. Die Aminosäuren der W-Helix weisen weitere Unterschiede auf. Das neutrale VAL581 des Myosin-9b entspricht in den Strukturen der Myosine 1 und 5 den hydrophoben PHE566 und 628, während im Myosin-2 an dieser Stelle das eher polare TYR634 zu finden ist.

## 5 Diskussion

### 5.1 Synthesen von *ortho*-funktionalisierten Biarylen

#### 5.1.1 *One-pot* SUZUKI-MIYAURA-Kreuzkupplung

Für einen sicheren und effizienten Zugang zu der Reihe von entwickelten *ortho*-substituierten Biarylen wurde der Syntheseweg über die SUZUKI-MIYAURA-Kreuzkupplung gewählt. Die Reaktionsführung bestand aus zwei Teilschritten: Der *in situ*-Erzeugung einer freien Boronsäure aus einem ersten halogenierten Reaktanten gefolgt von ihrer Umsetzung zum symmetrischen oder asymmetrischen Biaryl mit dem zweiten halogenierten Reaktanten. Innerhalb von Optimierungsansätzen wurde die optimale Reaktionsführung mit Ethanol als Lösungsmittel etabliert. Die *in situ*-Generierung der Boronsäure erfolgte über 0.5 h und ihre Umsetzung zum gewünschten Biaryl mit bromiertem oder chloriertem Reaktanten wurde unter Verwendung von festem, vorgetrockneten Kaliumkarbonat als Base anstelle einer wässrigen Lösung herbeigeführt.

Bei den Synthesen sind Nebenreaktionen wie die Zersetzung der erzeugten Boronsäure, sowie Dehalogenierung und Kreuzkupplung des ersten Reaktanten unmittelbar nach der Generierung der Boronsäure aufgetreten. Die Variation der Basenstärke in beiden Schritten der Reaktion führte zur Minderung von Ausbeuten, da die Menge der *in situ*-generierten Boronsäure verringert wurde oder die Dehalogenierungsreaktion vorrangig vor der Kreuzkupplung erfolgte<sup>120</sup>. Die besten Ausbeuten wurden durch eine genaue Einhaltung von 3 Äq. der jeweiligen Base in den entsprechenden Schritten der Reaktion erhalten. Die Kontrolle der Kreuzkupplung im ersten Schritt der Reaktion war trotz der genauen Einhaltung der Menge an Kaliumacetat bei der Erzeugung der Boronsäure nicht vollständig vermeidbar, konnte dennoch niedrig gehalten werden (ca. 5-15%). Die Umesterungsreaktion durch die nachträgliche Erhöhung der Menge des Kaliumkarbonats nach etwa 5 h Reaktionszeit im zweiten Reaktionsschritt ermöglichte hingegen das gezielte Erhalten von umgeesterten Produkten.

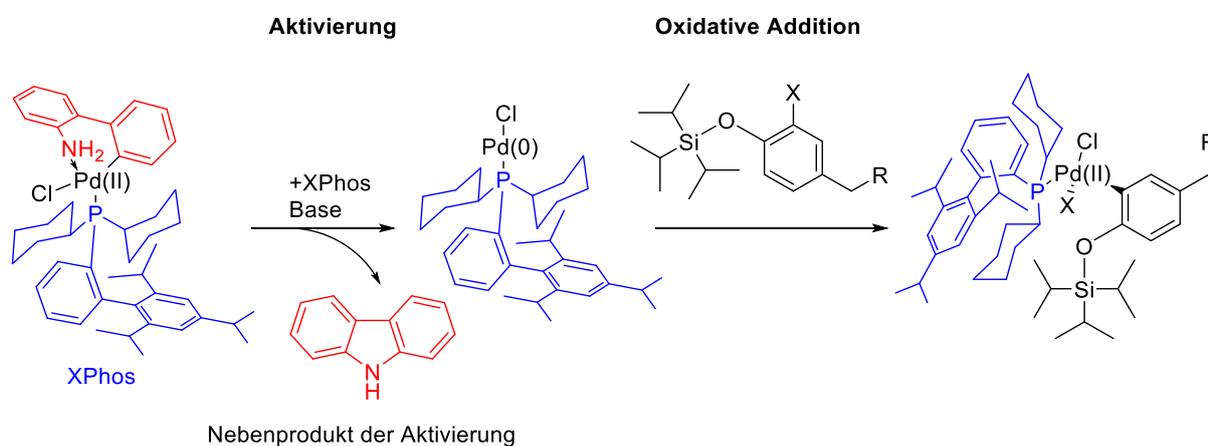
Der Einsatz von aliphatischen bzw. wenig polaren Edukten in der SUZUKI-MIYAURA-Kreuzkupplung ermöglichte einen sicheren Zugang zu hohen Mengen der entsprechenden Produkte **5**, **6**, **15**, **16** und **18**. Die benzylierten Endverbindungen konnten durch die Verseifungs- und Benzylierungsschritte auch unter Ausschluss der Reinigung von Vorläufern aus der Kreuzkupplung erfolgreich erhalten werden.

Die Umsetzung der Edukte mit polaren Amino-, Hydroxy- und vor allem Nitrosubstituenten zu den entsprechenden Produkten war mit sehr starken Limitierungen der Ausbeute verbunden. Zum einen können polare Gruppen innerhalb von Übergangsmetall-katalysierten Kreuzkupplungen (Suzuki, Stille, Negishi, Buchwald-Hartwig) eine Katalysatorinhibierung durch das Koordinieren der polaren Funktion an das Metallzentrum bewirken. Zum anderen kann die unerwünschte Koordination an das Metallzentrum nach dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, der oxidativen Addition des aktivierten Katalysators in die Aryl-Halogen-Bindung, erfolgen und den Komplex zerstören<sup>121,122,123</sup>. Aufgrund dieser Eigenschaften konnten die Kreuzkupplungsprodukte in den Ansätzen mit den nitrofunktionalisierten Fragmenten möglicherweise nicht erhalten werden. Von diesen Substanzen konnte lediglich das Biaryls **35** über die vierstufige *one-pot* SUZUKI-MIYAURA-Benzylierung-Synthesefolge erhalten werden. Im ersten Schritt der Kupplungsreaktion musste dafür das weniger polare Aminoderivat **32** eingesetzt werden. Die Substanzen **36** und **38**, die sowohl polare Hydroxy- als auch Nitrofunktionen aufweisen, wurden über die durch KO<sup>t</sup>Bu begünstigte radikalische C-C-Bindungsknüpfung erhalten.

Die Reinigung der Biaryle wurde durch ein Carbazol, welches bei der Aktivierung des Pd-XPhos-G2-Katalysators entsteht, erschwert (Schema 17). Unter Verwendung von aminfunktionalisierten Edukten, die vergleichsweise niedrige Polarität aufweisen, wurden die gewünschten Produkte zwar erhalten, ließen sich allerdings von den Nebenprodukten der Reaktion und der Katalysatoraktivierung nicht trennen. Die Trennung und somit eine erfolgreiche Reinigung konnte durch die Erweiterung der Reaktionssequenz erhalten werden und die benzylierten Endprodukte **34**, **35** und **41** konnten nach den vierstufigen *one-pot* Synthesefolgen isoliert werden. Durch die Funktionalisierung der Aminogruppe als Tosylat bei der Synthese der sterisch überfrachteten Biarylderivate **45**, **49** und **47**, konnte das Problem der Trennung ebenfalls erfolgreich behoben werden. Die Derivate **45** und **49**, sowie **47** wurden entsprechend aus den vierstufigen und zweistufigen *one-pot* Ansätzen erhalten.

Die Synthese der hydroxyfunktionalisierten Produkte **22**, **23**, **25** und **26** erfolgte unter Verwendung von TBDMS- oder TIPS-Schutzgruppe. Die Ausbeute wurde dabei durch die niedrige Stabilität der *tert*-Butyldimethylsilylschutzgruppe bei den stark basischen Bedingungen des zweiten Reaktionsschrittes limitiert. Die Abspaltung der Schutzgruppe hatte zwar den Vorteil, dass kein zusätzlicher Syntheseschritt für die Entschützung erforderlich war, allerdings erfolgte die Abspaltung in den Anfangs-

quenzen des zweiten Schrittes der Kreuzkupplung. Dadurch konnte der störende Effekt der Hydroxyfunktion zwar gemindert und die gewünschten Endverbindungen erhalten werden, die Erhöhung der erhaltenen Produktausbeute wurde allerdings nicht erreicht.



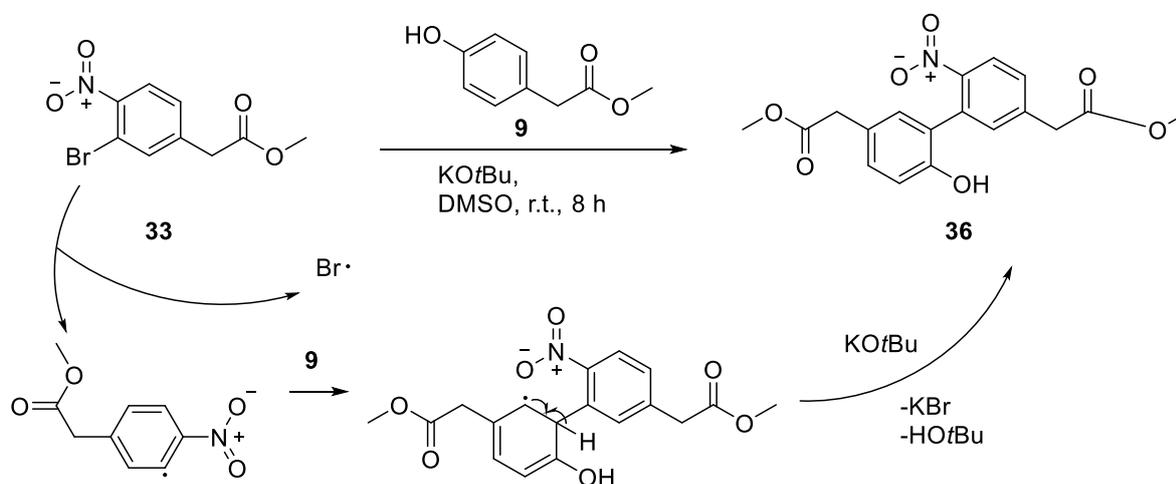
**Schema 17: Carbazol als Nebenprodukt der PdXPhos-GII-aktivierung und die oxidative Addition des Katalysators an die Aryl-Halogen-Bindung des TIPS-geschützten Aryls.**

Das Einsetzen des basisch stabileren Triisopropylsilyl-geschützten Derivates **21** führte bei den beschriebenen Bedingungen lediglich zur Entstehung von 70% des Halogenabspaltungsproduktes, sowie 25% des entschützten und dehalogenierten Phenols **9**. Die Dehalogenierungsreaktion könnte hierbei durch das Lösungsmittel nach dem Mechanismus von Navarro *et al.* erfolgen<sup>120</sup>. Bei diesem erfolgt die Abspaltung des Halogens aufgrund der Konkurrenzreaktion des Alkoholats im Transmetallierungsschritt der Kreuzkupplung, wobei das Alkoholat das Halogenatom aus dem Pd-Aryl-Komplex verdrängt und unter Ausbildung eines Aldehyds abgespalten wird, wodurch die Protonierung des Aryls an der Stelle des Halogenatoms erfolgt<sup>120</sup>. Die sterische Überfrachtung der Isopropylreste der TIPS-Gruppe mit den ebenfalls sterisch überfrachteten Resten des XPhos-Liganden kann die Konkurrenzreaktion begünstigen, da der Anteil des Dehalogenierungsproduktes im Falle des TBDMS-geschützten Eduktes lediglich 3-5% ausmachte (Schema 17).

Die SUZUKI-MIYAUURA-Kreuzkupplung wurde durch die durchgeführten Optimierungsansätze erfolgreich als Syntheszugang zu den biarylischen Inhibitoren etabliert. 14 der 16 geplanten benzylierten Verbindungen wurden durch diese Synthesroute erhalten und konnten in den Experimenten zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt werden. Der Ansatz ermöglichte, vor allem durch das Ergänzen des *one-pot* Kreuzkupplungsschrittes durch die Benzylierungsreaktion, einen schnellen und effizienten Zugang zu den meisten erstmalig synthetisch erhaltenen Endverbindungen.

### 5.1.2 Alternative Zugangsroute zu den nitrofunktionalisierten Inhibitoren

Die nitrofunktionalisierten Endverbindungen **38** und **36** wurden über einen alternativen Synthesezugang in der Übergangsmetall-freien C-C-Bindungsknüpfung zwischen einem Arylhalogenid und einem aktivierten Aryl in Anwesenheit von KOtBu mit anschließender Benzylisierung erhalten. Nach dem experimentell abgeleiteten Mechanismus von Barham *et al* erfolgt die Reaktion durch die *in situ* Erzeugung eines organischen Elektronendonors aus dem Halogenaryl (Schema 18). Der Elektronendonator initiiert die radikalische Bindungsknüpfung<sup>124</sup>. KOtBu tritt dabei als Base auf, die das Wasserstoffatom an der neugebildeten Biarylbindung entfernt und in Kombination mit der Regenerierung der radikalischen Spezies unter Abspaltung des Halogenid-Ions die Rearomatisierung herbeiführt (Schema 18). Durch diesen Mechanismus kann auch das Nichteintreten der Reaktion und kein Erhalten von eingesetzten Edukten bei der Synthese des Inhibitormoleküls **39** erklärt werden. Die sterische Hinderung durch den Methoxysubstituenten in der *ortho*-Position zur Biarylachse könnte den Zugang der Base zum Wasserstoffatom blockieren, wodurch die Rearomatisierung der aktivierten Spezies nicht erfolgen und ihre Zersetzung bzw. Nebenreaktionen mit den weiteren radikalischen Spezies eintreten würden.



Schema 18: Mechanismus der übergangsmetallfreien radikalischen C-C-Bindungsknüpfung in Anwesenheit des KOtBu.

### 5.1.3 Biomimetischer Weg und enzymatische Umsetzung des Biaryls

Innerhalb des ersten Schrittes des biomimetischen Syntheseansatzes wurde der Zugang zu drei möglichen symmetrischen und asymmetrischen Verbindungen ausgehend von den Edukten **8** und **9** getestet. Die entsprechende asymmetrische Verbindung konnte dabei weder durch die Reaktionsführung in der SiO<sub>2</sub>-Festphase noch aus dem Ansatz in der Mikrowellenapparatur erhalten werden. Die Synthesen

der symmetrischen Produkte **15** und **24** ergaben in der Festphasenreaktion nach 72 h die Produkte in sehr niedrigen Ausbeuten von maximal 6%. Die Überführung der Reaktion in die Mikrowellenapparatur ergab lediglich für das Intermediat **24** eine Verbesserung der Ausbeute auf 20%.

In dem Schritt der enzymatischen Monoverseifung des symmetrischen Biaryls an den Esterfunktionen wurde das Potential der Hydrolyse durch die meisten eingesetzten Lipasen nachgewiesen. Innerhalb von Optimierungsansätzen konnte für die Lipasen des Pilzes *Rhizopus oryzae* und der Schweineleber die Abhängigkeit der Esterhydrolyse von den Funktionen in den *ortho*-Positionen gezeigt werden, da die Verbindung **15** im Gegensatz zur Verbindung **5** nicht umgesetzt wurde. Bei der Differenzierung der Esterfunktionen zwischen Methyl- und Ethylestern durch alle eingesetzten Enzyme wurde kein Unterschied festgestellt. Die Enzyme sind für das Spalten von Lipiden mit längeren Fettsäuren in Organismen und Pflanzen bekannt, weshalb die Verlängerung der aliphatischen Esterkette von Methyl auf Ethyl keinen Unterschied darstellt<sup>125</sup>. Ebenfalls wurde die Abhängigkeit der enzymatischen Monoverseifung von der Zusammensetzung des Lösungsmittels gezeigt. Bei einem Anteil des organischen Lösungsmittels von 10% konnte für beide in den Optimierungstests verwendete Lipasen (*C. antarctica* Lipase B und *C. rugosa*) die Monoverseifung festgestellt werden.

Der Aufbau des biarylischen Grundkörpers über die Eisenchlorid-vermittelte oxidative C-C-Bindungsknüpfung zwischen zwei Arylen konnte erst nach der Überführung der Reaktionsführung in die Mikrowellenapparatur unter Erhalten von optimalen Ergebnissen für eine der Zielverbindungen erfolgen. Bei der enzymatischen Esterhydrolyse wurde für einige der Lipasen ein Zusammenhang zwischen der Größe des *ortho*-Substituenten an der Biarylachse und der hydrolytischen Aktivität der Lipasen festgestellt, während die Länge der Esterfunktionen keinen Unterschied zeigte. Ebenfalls konnten die ersten optimalen Bedingungen, bei denen die asymmetrische Hydrolyse erfolgen kann, ermittelt werden. Es sind allerdings weitere Studien notwendig, um Lipasen gezielt für die biokatalytische Synthese von asymmetrischen biarylischen Inhibitoren einsetzen zu können.

## 5.2 Studien der Struktur-Aktivitätsbeziehung der Biaryle

### 5.2.1 *Ortho*-Funktionalisierung und inhibitorischer Effekt der Biaryle

Die Variation der *ortho*-Substituenten des biarylischen Grundgerüsts erbrachte in den *in vitro* Studien eine Herabsetzung der IC<sub>50</sub>- und EC<sub>50</sub>-Werte bis in den niedrigen nanomolaren Konzentrationsbereich. Die Funktionalisierung von *ortho*-Positionen mit polaren Hydroxy- und Aminogruppen, die sowohl basische als auch azide Eigenschaften aufweisen können, erbrachte im Vergleich zum *ortho*-unfunktionalisierten Biaryl **7** (IC<sub>50</sub>=114 µM) eine zweifache Verringerung der IC<sub>50</sub>-Werte. Die Kombination dieser Substituenten mit Methoxyfunktionen, die als Wasserstoffbrückenakzeptoren fungieren können, führte zu einer weiteren Herabsetzung des IC<sub>50</sub>-Wertes. Ein vergleichbarer Trend wurde in den *in vitro* Experimenten mit dem *Pf*-Stamm 3D7 und den dabei ermittelten EC<sub>50</sub>-Werten beobachtet. Der EC<sub>50</sub>-Wert der methoxy-, hydroxyfunktionalisierten Verbindung **22** konnte durch Substitution einer der *ortho*-Positionen mit Methoxyfunktion im Biaryl **19** genau wie der IC<sub>50</sub>-Wert in den ATPase Experimenten nahezu halbiert werden. Die vollständige Eliminierung des Potentials, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, in den Substituenten mit Methoxy- und Benzyloxygruppen, führte zum Erreichen der niedrigen mikro- und sogar nanomolaren Konzentrationsbereiche bei der Quantifizierung des Effektes auf das Myosin A-Modell und auf die parasitäre Proliferation *in vitro*.

Der niedrigste IC<sub>50</sub>-Wert wurde für das Biaryl **38**, bei dem beide *ortho*-Positionen mit den wasserstoffbrückenakzeptierenden NO<sub>2</sub>-Gruppen funktionalisiert sind, ermittelt. Durch die kombinierte NO<sub>2</sub>-Funktionalisierung mit den Wasserstoffbrückendonoren (OH und NH<sub>2</sub>-Gruppe) in den entsprechenden Derivaten **36** und **35** wurde der inhibitorische Effekt auf die ATPase Aktivität des Myosin A-Modells verringert, wodurch der Vorteil des wasserstoffbrückenakzeptierenden Charakters der *ortho*-Substituenten hervorgehoben wurde.

In den *in vitro* Experimenten mit den nicht resistenten und multiresistenten *Pf*-Stämmen 3D7 und 7G8 wurde der Vorteil der zusätzlichen Erhöhung des aliphatischen Anteils in den *ortho*-Positionen der Biaryle **27** und **45** ersichtlich, da die Biaryle **38**, **36** und **35** vermutlich aufgrund der geringen Membrangängigkeit einen schwachen inhibitorischen Effekt auf die parasitäre Proliferation zeigten. *In silico* Experimente lassen ein zusätzliches Wechselwirkungspotential im Bereich der *Strut*-Schleife und einen positiven Effekt durch die sterische Überfrachtung in einer der beiden *ortho*-Positionen durch die Benzyloxy- und Aminotosylgruppen der beiden

Biaryle vermuten. Beide Verbindungen zeigten in den parasitären Experimenten einen signifikanten Effekt auf die Proliferation sowie die Glideosom-abhängigen Vorgänge wie Invasion und *Egress*. Die vorteilhaften Eigenschaften des Wasserstoffbrückenakzeptors in Kombination mit dem sterischen Effekt der Aryle in nur einer der *ortho*-Positionen am biarylischen Grundgerüst wurden durch die besseren  $IC_{50}$ - und  $EC_{50}$ -Werte des Biaryls **50** im Vergleich zu den asymmetrischen Biarylen **27** und **45** hervorgehoben.

### 5.2.2 Benzylester entscheidend für die inhibitorische Aktivität

Innerhalb der Studien zur Struktur-Aktivitätsbeziehung des inhibitorischen Effektes seitens der Biaryle auf die ATPase-Aktivität des Myosin A-Modells wurde die entscheidende Rolle der benzyliischen Esterfunktionen ebenfalls ersichtlich. In den Kontrollexperimenten wurde für das benzylierte Biaryl **26** ( $IC_{50}=55 \mu\text{M}$ ) ein zweifach höherer Effekt als für den entsprechenden Dimethylester **24** ( $IC_{50}=90 \mu\text{M}$ ) ermittelt. Ein deutlicherer Effekt der Abwesenheit der Benzylester wurde für die sterisch überfrachteten Biaryle **47** und **48** beobachtet. Für das Biaryl **47** konnte kein messbarer inhibitorischer Effekt ermittelt werden, während das benzylierte Biaryl **48** einen  $IC_{50}$ -Wert von  $45.0 \mu\text{M}$  aufwies. Das Derivat **50**, welches in den *ortho*-Positionen mit den sterisch weitaus überfrachteten *N*-Benzyl-*N*-Tosylgruppen funktionalisiert wurde, inhibierte die ATPase-Aktivität des Myosin A-Modells mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration von  $52 \mu\text{M}$ . Die Aspekte zusammen deuten darauf, dass der Dimethylester **47** die anvisierte allosterische Tasche eventuell aufgrund von polaren Wechselwirkungen seitens der Carboxygruppen nicht erreichen konnte. Hinweise dafür wurde ebenfalls in den *in silico* Experimenten erhalten. Die Positionierung der Methylester **24** und **47** wurde in den Bereichen der Schleife-2 und HO-Helix aufgrund von polaren Interaktionen mit den Aminosäuren der Schleife-2 seitens der  $SO_2$ -Gruppe der Tosylfunktion oder der Sauerstoffatome der Carboxygruppe als die energetisch günstigste ermittelt. Die energetisch günstigsten Positionen der Derivate **48** und **50** wurden hierbei näher an der  $\beta 7$ -Schleife kalkuliert.

Die Benzylester können somit nicht nur bei dem Aufbau der aromatischen Interaktionen innerhalb, sondern ebenfalls bei der Belegung bzw. dem Erreichen der allosterischen Tasche, in der die für die inhibitorische Wirkung der Biaryle wichtige Interaktionen ausgebildet werden, eine entscheidende Rolle spielen. Dies kann sich im hydrophoben Abschirmungseffekt äußern.

### 5.2.3 Effekt der Biaryle auf die Allosterie im Myosin A

Die *in silico*-Kalkulationen lieferten für die jeweiligen Protein-Biaryl-Komplexe Werte der Gibbs-Energie, die die energetische Stabilität des Komplexes und somit der Protein-Inhibitor-Wechselwirkung einschätzen ließen. Die kalkulierten  $\Delta G$ -Werte standen dabei in einer guten Korrelation mit den *in vitro* ermittelten  $IC_{50}$ -Werten. Die Korrelation deutet auf eine gute Annäherung der *in silico*-Simulationen an Vorgänge im Protein-Biaryl-Komplex unter *in vitro*-Bedingungen. Hierbei konnten aus den durchgeführten *in silico*-Experimenten in der Anwesenheit der biarylischen Inhibitoren mechanistische Zusammenhänge abgeleitet werden, die für die Struktur-Aktivitätsdaten eine potentielle Erklärung liefern.

Die Interaktionen der biarylischen Inhibitoren in der Standardposition über der  $\beta 7$ -Schleife und der Ausrichtung des biarylischen Grundgerüsts entlang der *Cleft* des Myosins wirkten destabilisierend auf die Salzbrücke-1. Die zweite Salzbrücke zwischen ARG247 (Schalter-1) und GLU273 ( $\beta 7$ -Schleife) wurde hingegen in allen Simulationen mit Ausnahme von Kontrollexperimenten mit abweichenden Positionen des Inhibitors stabilisiert. Dies wurde durch die Interaktionen des Inhibitors mit den LEU271 und 272, sowie dem Rückgrat des LYS274 herbeigeführt, wobei das LYS274 wiederum mit dem GLU441 der HO-Helix in allen Simulationen in Wechselwirkung trat. Durch diese Interaktionen wird die  $\beta 7$ -Schleife in relativ starrer Interaktion mit der HO-Helix und dem Schalter-1 verbunden. Dadurch kann die Beweglichkeit des  $\beta 7$ -Stranges des zentralen *Transducers* eingeschränkt werden, die einen Teil der allosterischen Kommunikation zwischen der Nukleotid- und Aktinbindestellen darstellt<sup>31</sup>.

Zusätzlich konnte durch die Positionierung der Inhibitormoleküle ein stabilisierender Effekt auf die Interaktion zwischen der *Strut*-Schleife und der *Relay*-Helix durch die Aminosäuren LYS600 und GLU482 festgestellt werden. Einerseits können die *ortho*-Substituenten mit freien Elektronenpaaren (Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen) für das LYS600 eine zusätzliche Koordinationsstelle liefern, wodurch die Interaktion mit GLU482 verfestigt wird. Andererseits kann die Beweglichkeit des LYS600 aufgrund der ASP603-LYS274-Interaktion durch die sterisch überfrachteten Substituenten an der *ortho*-Position des Inhibitors eingeschränkt werden, wodurch die Interaktion des LYS600 mit GLU482 ebenfalls begünstigt wird. Die ASP603-LYS274-Interaktion soll laut Behrens *et al.* für die Steuerung der basalen ATPase-Aktivität des Myosin in Abwesenheit des Aktins eine wichtige Rolle spielen. Diese

Interaktion wurde in den Simulationen in Abwesenheit eines Inhibitormoleküls beobachtet, wodurch die LYS600-GLU482-Interaktion unterbrochen und für die *Relay*-Helix eine Neigungsbewegung ermöglicht wurde (Abbildung 29). Die Wechselwirkung zwischen LYS274 und ASP603 wurde in Anwesenheit eines Inhibitors nicht eingeschränkt, wogegen die Interaktion des LYS274 mit GLN644 (W-Helix) nicht zustande kommen konnte. Diese Interaktion ist Untersuchungen von Behrens *et al.* zufolge für die Steuerung der Freisetzung vom Hydrolyseprodukt bedeutend<sup>51</sup>.

In den Flashphotolyse-Experimenten, in denen die Akto-Myosin-Dissoziation zeitaufgelöst betrachtet wurde, wurde eine Biaryl-bedingte Zunahme der Geschwindigkeitskonstante der ATP-Umsetzung ( $k_{\text{cat}}$ ) durch das Myosin A-Modell festgestellt. Die Experimente wurden bei einem Aktin-Myosin-Konzentrationsverhältnis durchgeführt, das nahe dem basalen Zustand des Proteins entspricht. Diese Beobachtung steht in einer guten Korrelation zu der in den MD-Simulationen beobachteten LYS274-ASP603-Interaktion, die die basale ATPase-Aktivität der Myosine steuern soll (Behrens *et al.*<sup>51</sup>) und in den Simulationen sowohl mit als auch ohne Inhibitor ermöglicht wurde. In den Flashphotolyse-Experimenten in Anwesenheit der Biaryle wurde ebenfalls eine Abnahme der Bindeaffinität des Myosin A-Modells zum ATP beobachtet. Dadurch wurde die Zeit der Dissoziation nahezu verdoppelt. Zugleich wurde die Signalamplitude in den Experimenten mit Inhibitoren **17**, **27** und **38** verringert, weshalb laut Weiss *et al.* eine Verringerung des vom Aktin abgelösten Myosins interpretiert werden kann<sup>113</sup>. Die *in silico* und *in vitro* Experimente deuten darauf, dass Biaryle durch ihre Positionierung im Bereich nahe dem Bindebereich des Aktins im Myosin A allosterische Veränderungen verursachen, die die Stabilität des Akto-Myosin-Komplexes sowie ATP-gebundenen Prozesse verändern. Die in den MD-Simulationen beobachteten Protein-Biaryl-Interaktionen finden im Bereich der *Cleft* statt, der eng in den Bindeprozess des Aktins eingebunden ist. Diese Interaktionen können zur Störung der innerhalb der Myosine konservierten allosterischen Kommunikation zwischen dem Nukleotid- und Aktinbindebereich führen, wodurch die beobachteten Veränderungen der Akto-Myosin-Dissoziation möglich werden. Eine vergleichbare Störung der allosterischen Kommunikation wurde durch Chinthalapudi *et al.* für das Pentabromopseudilin beschrieben<sup>50</sup>.

Die in den MD-Simulationen beobachtete Protein-Inhibitor-Wechselwirkungen, sowie die intramolekularen Interaktionen deuten auf einen störenden Effekt seitens der

biarylischen Inhibitoren auf mehrere Aspekte der allosterischen Kommunikation zwischen der Nukleotidbindestelle und dem Bereich der Aktininteraktion hin. Vor allem erstreckt sich der Effekt auf die Flexibilität der *Transducer*-Elemente und die LYS274-GLN644-Interaktion, wodurch die allosterische Modulierung des Bereiches um das LYS274 eingeschränkt werden kann. Die Biaryl-bedingten kinetischen Veränderungen der Akto-Myosin-Dissoziation, die in den Flashphotolyse-Experimenten festgestellt wurden, stehen in einer guten Übereinstimmung mit den *in silico*-Experimenten und geben eine experimentelle Bestätigung für eine aktive Veränderung der allosterischen Kommunikation innerhalb des Motorproteins.

### 5.3 Niedrige toxische Wirkung der biarylischen Inhibitoren

Alle 16 der synthetisierten Inhibitoren wurden auf ihre Zytotoxizität getestet. Die meisten der Verbindungen zeigten keinen hohen toxischen Effekt auf die verwendeten Zellen der menschlichen Blut-Hirn-Schranke. Der toxische Effekt scheint hauptsächlich durch die symmetrische Funktionalisierung der Leitstruktur mit den Gruppen, die ein protonendonierendes Potential aufweisen, verstärkt zu werden. Die entsprechenden Verbindungen **26**, **34** und **48** mit Hydroxy-, Amino- und Tosylamino-gruppen weisen einen  $CC_{50}$ -Wert von ca. 200  $\mu\text{M}$  auf. Für die unfunktionalisierte Verbindung **7** wurde ein  $CC_{50}$ -Wert von ca. 800  $\mu\text{M}$  und somit eine vierfach niedrigere Toxizität ermittelt. Das gleiche gilt für die Substanzen, bei denen die genannten Gruppen polaren Substituenten kombiniert werden (Inhibitoren **36** und **35**). Die ermittelten  $CC_{50}$ -Werte aller anderen Verbindungen liegen im Bereich von 500-1000  $\mu\text{M}$  und bestätigen diese Beobachtung. Von den Biarylen mit polaren  $\text{NO}_2$ -Gruppen (Inhibitor **38**) oder den sterisch überfrachteten Benzyl- bzw. Methoxygruppen, sowie von den Biarylen mit nur einer Hydroxy- oder Tosylaminofunktion, geht eine sehr geringe toxische Wirkung aus, da die  $CC_{50}$ -Werte über 1000  $\mu\text{M}$  liegen. Aufgrund der zugleich niedrigen  $IC_{50}$ -Werte liegen die Selektivitätsindexe solcher Verbindungen in Bereichen von 50 bis 35000, wodurch eine hohe Spezifität der inhibierenden Wirkung und das therapeutische Potential der Verbindungen hervorgehoben werden.

### 5.4 Hohe inhibitorische Aktivität gegenüber *Plasmodium falciparum*

Bei den Experimenten mit den parasitären Stämmen 3D7 und 7G8 wurde mit allen getesteten Verbindungen ein inhibierender Effekt auf die Proliferation des Parasiten festgestellt. Verbindungen, die bei den Experimenten mit dem Myosin A-Modell die höchsten inhibitorischen Effekte zeigten (Biaryle **38**, **36** und **35**), wiesen eine deutlich

geringere Inhibierung der Proliferation vom parasitären Stamm 3D7 auf ( $EC_{50}$ -Werte bei 10-25  $\mu\text{M}$ ). Der  $EC_{50}$ -Wert des Biaryls **38** betrug das 700-fache des  $IC_{50}$ -Wertes. Der starke Unterschied ist eventuell durch eine geringe Membrangängigkeit der Verbindungen mit den polaren funktionellen Gruppen zu erklären, da der Effekt des Nitro- und Aminfunktionalisierten Biaryls **35** im Vergleich zum Biaryl **38** um das Dreifache verbessert wurde ( $EC_{50}=9 \mu\text{M}$  und  $EC_{50}=24$ ). Bevor ein potentieller Inhibitor das Zielprotein Myosin A im parasitären Glideosom erreichen kann, muss die äußere Membran überwunden werden. Die Oberfläche der Membran beinhaltet eine hohe Anzahl an funktionellen Proteinen, die vor allem mit polaren funktionellen Gruppen Interaktionen eingehen können<sup>126</sup>. Dadurch kann nicht sicher davon ausgegangen werden, dass die gesamte Stoffmenge der eingesetzten Substanzen das Zielprotein erreichen konnte. Zusätzlich zu den potentiellen Einschränkungen in der Membrangängigkeit wurde für das Biaryl **38** ein auffälliger Effekt auf die Morphologie der Erythrozyten festgestellt (Abbildung 19), der ebenfalls durch das hohe Interaktionspotential der  $\text{NO}_2$ -Gruppen des Biaryls verursacht werden könnte. Dieser Effekt wurde mit den Inhibitoren **35** und **36**, bei denen die  $\text{NO}_2$ -Gruppe jeweils durch eine Hydroxy- und eine Aminogruppe ergänzt wird, nicht beobachtet.

Für die sterisch überfrachteten und mit aliphatischen Gruppen funktionalisierten Biaryle **27**, **48** und **50** wurde der beste inhibitorische Effekt festgestellt. Diese hatten einen hochsignifikanten inhibitorischen Effekt auf die Parasitämie und verhinderten die parasitäre Invasion mit dem stärksten Effekt. Die parasitären Ringe waren in den Experimenten mit diesen Verbindungen nahezu vollständig eliminiert. Durch diesen Aspekt lässt sich der Effekt auf das Invasionsverhalten des Parasiten bestimmen. Die Verbindungen mit einem geringen Effekt auf die parasitäre Proliferation setzen allerdings den Anteil der Ringe pro Erythrozyten ebenfalls signifikant herab, wodurch ebenfalls ein signifikanter Effekt auf die Invasion des Parasiten abgeleitet werden kann. Der Prozess des *Egress* der neuentstandenen Merozoiten aus dem Schizonten konnte durch die Verbindungen **27**, **48** und **50** ebenfalls signifikant eingedämmt werden. Sowohl der *Egress* als auch die Invasion sind Glideosom-abhängige Prozesse. Die signifikante Inhibierung beider Prozesse in parasitären Experimenten, sowie die Korrelation der *in vitro* Aktivitätsdaten deuten auf einen inhibitorischen Effekt der Biaryle auf das Motorprotein Myosin A als den Ursprung der Proliferationshemmung. Die durchgeführten Experimente reichen allerdings nicht aus, um den Effekt auf das Myosin A eindeutig einzuschränken.

### 5.5 DBC-Selektivität resultiert aufgrund einer spezifische Position im Myoin-9

Die *in silico*-Studie des selektiven inhibierenden Effektes seitens des halogenierten Carbazols DBC auf die ATPase-Aktivität des *RnMyosin-9b* ergab stabile Interaktionen in der allosterischen Tasche in einem Bereich, der in der direkten Nähe zur allosterischen Tasche des Blebbistatin lokalisiert ist. Die Ergebnisse stehen in einer guten Korrelation mit der experimentell ermittelten Aktivität des Blebbistatin gegenüber dem *RnMyosin-9b*<sup>114</sup>. Auch wenn das Blebbistatin für die Inhibierung von nichtmuskel-Myosinen der Klasse 2 bekannt ist, zeigte DBC selbst bei den höheren Konzentrationen keinen inhibitorischen Effekt auf die ATPase-Aktivitäten der getesteten Myosinen der Klasse 2. Diese Unterschiede deuten darauf, dass das Bindevverhalten des Blebbistatin im *RnMyosin-9b* mit dem im Myosin-2 nicht oder nicht vollständig übereinstimmen kann. Zusätzlich wurde für das Blebbistatin durch Alingham *et al.* gezeigt, dass die Unterschiede in der Inhibierung der Aktivität von Myosinen der glatten Muskultur mit weitaus geringerem Effekt als die des zellulären Skeletts von dem Effekt der Interaktionen der zweiten Interaktionssphäre herrühren<sup>116</sup>. Dadurch wird das Binden des Blebbistatins nach dem *induced fit*-Mechanismus eingeschränkt. Die Bindestelle, die innerhalb der Studie gefunden wurde, ermöglicht eine ähnliche Erklärung. Die Tasche überlagert zu einem relativ großen Anteil mit der Blebbistatinbindestelle, weist allerdings eine sequentielle Homologie von 38% zu dieser auf. Aufgrund der Molekülgröße des Blebbistatin könnten in dem ermittelten Bereich der DBC-Aktivität im *RnMyosin-9b* dennoch ausreichend starke Wechselwirkungen entstehen, um die ATPase-Aktivität des Proteins signifikant zu inhibieren.

Die Quantifizierung der Interaktionsstabilität der Protein-Inhibitor-Komplexe über die Gibbs-Energie ergab für beide Inhibitoren DBC und DMC den Bereich in der Nähe der Bindestelle des Blebbistatin als energetisch günstigste Lage. Der Bereich der *Cleft* beinhaltet einige Sekundärstrukturelemente des Motorproteins, die für die konformationellen Veränderungen des Proteins, sowie die allosterische Kommunikation zwischen der Nukleotidbindestelle und der Aktinbinderegion des Proteins eine hohe Bedeutung haben. Unter diesen sind die Schalter 1 und 2, die *Relay*-Helix und das zentrale siebensträngige *Transducer*. Die stabilen Interaktionen in diesem Bereich der *Cleft* können durchaus die Flexibilität der Elemente blockieren und somit zur Inhibierung der ATPase-Aktivität des Motorproteins führen.

Die Ergebnisse der Studie liefern für die Aktivität des DBC gegenüber *RnMyosin-9b* eine plausible Erklärung, da die Position, die für das DBC in dem Myosin der Klasse 9 als die mit der höchsten Affinität und energetisch günstigster Lage ermittelt wurde, in den anderen Myosinen entweder gar nicht oder nur mit vergleichsweise hohen Gibbs-Energien, und somit mit keinen stabilen Interaktionen populiert wird. Dadurch kann die bevorzugte Inhibierung des Myosin-9b resultieren. Die sequenziellen Ähnlichkeiten zwischen Myosin-9 und Myosin-1 lassen ebenfalls die Möglichkeit der labilen Interaktionen zu, die zur experimentell ermittelten partiellen Inhibierung des Motorproteins der Klasse 1 durch DBC führen kann.

## 6 Literaturverzeichnis

1. WHO. *World Malaria Report. 2018. ISBN 978 92 4 156469 4.*; 2018. doi:ISBN 978 92 4 1564403
2. Mueller I, Galinski MR, Baird JK, et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis.* 2009;9(9):555-566. doi:10.1016/S1473-3099(09)70177-X
3. Snow R, Guerra C, Noor A, Myint H, Hay S. Patterns and controls of nitrous oxide emissions from waters draining a subtropical agricultural valley. *Global Biogeochem Cycles.* 2005;17(3):214-217. doi:10.1029/2002gb001991
4. Udeinya IJ, Graves PM, Carter R, Aikawa M, Miller LH. *Plasmodium falciparum*: Effect of time in continuous culture on binding to human endothelial cells and amelanotic melanoma cells. *Exp Parasitol.* 1983;56(2):207-214. doi:10.1016/0014-4894(83)90064-4
5. Gowda DC, Thylur RP, Dayanand KK, Wu X, Norbury CC. Small molecule–based inhibition of MEK1/2 proteins dampens inflammatory responses to malaria, reduces parasite load, and mitigates pathogenic outcomes. *J Biol Chem.* 2017;292(33):13615-13634. doi:10.1074/jbc.m116.770313
6. Helmy H, Cavalier L, Pettersson U, Wahlgren M. Rosetting *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes express unique strain-specific antigens on their surface. *Infect Immun.* 1993;61(1):284-288.
7. Yam XY, Preiser PR. Host immune evasion strategies of malaria blood stage parasite. *Mol Biosyst.* 2017;13(12):2498-2508. doi:10.1039/c7mb00502d
8. Baum J, Richard D, Healer J, et al. A Conserved Molecular Motor Drives Cell Invasion and Gliding Motility across Malaria Life Cycle Stages and Other Apicomplexan Parasites \* □. 2006;281(8):5197-5208. doi:10.1074/jbc.M509807200
9. Cowman AF, Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell.* 2006;124(4):755-766. doi:10.1016/j.cell.2006.02.006
10. James SP, Tate P. New knowledge of the life-cycle of malaria parasites [1]. *Nature.* 1937;139(3517):545. doi:10.1038/139545a0
11. Rankin KE, Graewe S, Heussler VT, Stanway RR. Imaging liver-stage malaria parasites. *Cell Microbiol.* 2010;12(5):569-579. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01454.x
12. Bannister LH, Mitchell GH, Butcher GA, Dennis ED, Cohen S. Structure and development of the surface coat of erythrocytic merozoites of *Plasmodium knowlesi*. *Cell Tissue Res.* 1986;245(2):281-290. doi:10.1007/BF00213933
13. Mcfadden GI, Reith ME, Munholland J, Lang-Unnasch N. Nature 1996 Ferster.pdf. *Nature.* 1996;381:482.
14. Roos D, Crawford M, Donald R, Kissinger JC, Klimczak LJ, Striepen B. Origin , targeting , and function of the apicomplexan plastid David S ROOS \*, Michael J Crawford , Robert GK Donald ,. *J Cell Sci.* 1999;2:426-432.
15. Barale J, Blisnick T, Fujioka H, et al. *Plasmodium falciparum* subtilisin-like protease 2 , a merozoite candidate for the merozoite surface protein 1 – 42 maturase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(May):6445-6450.

16. Aikawa M, Miller LH, Johnson J, Rabbege J. Erythrocyte entry by malarial parasites. *J Cell Biol.* 1978;77(1):72-82. doi:10.1083/jcb.77.1.72
17. Portugal S, Drakesmith H, Mota MM. Superinfection in malaria: Plasmodium shows its iron will. *EMBO Rep.* 2011;12(12):1233-1242. doi:10.1038/embor.2011.213
18. Klemba M, Gluzman I, Goldberg DE. A Plasmodium falciparum dipeptidyl aminopeptidase I participates in vacuolar hemoglobin degradation. *J Biol Chem.* 2004;279(41):43000-43007. doi:10.1074/jbc.M408123200
19. Preiser PR, Khan S, Costa F, et al. Stage-Specific Transcription of Distinct Repertoires Cycle Stage-Specific Transcription of Distinct Repertoires of a Multigene Family During Plasmodium Life Cycle. *Sci Rep.* 2002;295:342-345. doi:10.1126/science.1064938
20. Smith RC, Barillas-Mury C. Plasmodium Oocysts: Overlooked Targets of Mosquito Immunity. *Trends Parasitol.* 2016;32(12):979-990. doi:10.1016/j.pt.2016.08.012
21. Cowman AF, Berry D, Baum J. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *J Cell Biol.* 2012;198(6):961-971. doi:10.1083/jcb.201206112
22. Bergman LW, Kaider K, Fujioka H, et al. Myosin A tail domain interacting protein (MTIP) localizes to the inner membrane complex of Plasmodium sporozoites. *J Cell Sci.* 2002;116(1):39-49. doi:10.1242/jcs.00194
23. Gaskins E, Gilk S, DeVore N, Mann T, Ward G, Beckers C. Identification of the membrane receptor of a class XIV myosin in Toxoplasma gondii. *J Cell Biol.* 2004;165(3):383-393. doi:10.1083/jcb.200311137
24. Bloemink MJ, Geeves MA. Shaking the myosin family tree: Biochemical kinetics defines four types of myosin motor. *Semin Cell Dev Biol.* 2011;22(9):961-967. doi:10.1016/j.semcdb.2011.09.015
25. Hofmann WA, Richards TA, de Lanerolle P. Ancient animal ancestry for nuclear myosin. *J Cell Sci.* 2009;122(5):636-643. doi:10.1242/jcs.030205
26. Goode BL, Drubin DG, Barnes G. Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr Opin Cell Biol.* 2000;12(1):63-71. doi:10.1016/S0955-0674(99)00058-7
27. Rock RS. Intracellular Transport: Force Controls Motor Switching at Filament Junctions. *Curr Biol.* 2010;20(12):R525-R527. doi:10.1016/j.cub.2010.04.002
28. Seb e-Pedr os A, Grau-Bov e X, Richards TA, Ruiz-Trillo I. Evolution and classification of myosins, a paneukaryotic whole-genome approach. *Genome Biol Evol.* 2014;6(2):290-305. doi:10.1093/gbe/evu013
29. Foth BJ, Goedecke MC, Soldati D. New insights into myosin evolution and classification. *Proc Natl Acad Sci.* 2006. doi:10.1073/pnas.0506307103
30. Thompson RF, Langford GM. Myosin superfamily evolutionary history. *Anat Rec.* 2002;268(3):276-289. doi:10.1002/ar.10160
31. Preller M, Manstein DJ. *Myosin Motors: Structural Aspects and Functionality.* Vol 4. Elsevier Ltd.; 2012. doi:10.1016/B978-0-12-374920-8.00410-0
32. Krendel M, Mooseker MS. Myosins : Tails ( and Heads ) of Myosin Superfamily : Diversity of. 2018:239-251.
33. M. Hartman JS. Frequent Activation of ret Protooncogene by Fusion with a New Activating

- Gene in Papillary Thyroid Carcinomas. *myosin superfamily a glance*. 2102;125:1627-1632. doi:10.1242/jcs.094300
34. Ouderkirk JL, Krendel M. Non-muscle myosins in tumor progression, cancer cell invasion, and metastasis. *Cytoskeleton*. 2014;71(8):447-463. doi:10.1002/cm.21187
  35. Fujita-Becker S, Tsiavaliaris G, Ohkura R, Shimada T, Manstein DJ, Sutoh K. Functional characterization of the N-terminal region of myosin-2. *J Biol Chem*. 2006;281(47):36102-36109. doi:10.1074/jbc.M605171200
  36. Joel PB, Trybus KM, Sweeney HL. Two Conserved Lysines at the 50/20-kDa Junction of Myosin Are Necessary for Triggering Actin Activation. *J Biol Chem*. 2001;276(5):2998-3003. doi:10.1074/jbc.M006930200
  37. Ponomarev MA, Furch M, Levitsky DI, Manstein DJ. Charge changes in loop 2 affect the thermal unfolding of the myosin motor domain bound to F-actin. *Biochemistry*. 2000;39(15):4527-4532. doi:10.1021/bi992420a
  38. De La Cruz EM, Wells AL, Rosenfeld SS, Ostap EM, Sweeney HL. The kinetic mechanism of myosin V. *Proc Natl Acad Sci*. 1999;96(24):13726-13731. doi:10.1073/pnas.96.24.13726
  39. Goodson H V., Warrick HM, Spudich JA. Specialized conservation of surface loops of myosin: Evidence that loops are involved in determining functional characteristics. *J Mol Biol*. 1999;287(1):173-185. doi:10.1006/jmbi.1999.2565
  40. Yengo CM, Sweeney HL. Functional Role of Loop 2 in Myosin V. *Biochemistry*. 2004;43(9):2605-2612. doi:10.1021/bi035510v
  41. Nalavadi V, Nyitrai M, Bertolini C, Adamek N, Geeves MA, Bahler M. Kinetic mechanism of myosin IXB and the contributions of two class IX-specific regions. *J Biol Chem*. 2005;280(47):38957-38968. doi:10.1074/jbc.M507161200
  42. Lynn RW, Taylor EW. Mechanism of Adenosine Triphosphate Hydrolysis by Actomyosin. *Biochemistry*. 1971;10(25):4617-4624. doi:10.1021/bi00801a004
  43. Kato Y, Miyakawa T, Tanokura M. Overview of the mechanism of cytoskeletal motors based on structure. *Biophys Rev*. 2018;10(2):571-581. doi:10.1007/s12551-017-0368-1
  44. Sugi H, Chaen S, Akimoto T. Electron microscopic recording of the power and recovery strokes of individual myosin heads coupled with ATP hydrolysis: Facts and implications. *Int J Mol Sci*. 2018;19(5). doi:10.3390/ijms19051368
  45. Dong C, Chen B. Temperature effect on the chemomechanical regulation of substeps within the power stroke of a single Myosin II. *Sci Rep*. 2016;6(December 2015):1-10. doi:10.1038/srep19506
  46. Masuda T. Molecular dynamics simulation for the reversed power stroke motion of a myosin subfragment-1. *BioSystems*. 2015;132-133:1-5. doi:10.1016/j.biosystems.2015.04.001
  47. Cornea S, Johnsrud DO, Thomas DD, Rohde JA, Muretta JM. Direct real-time detection of the structural and biochemical events in the myosin power stroke. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(46):14272-14277. doi:10.1073/pnas.1514859112
  48. Veigel C, Schmitz S, Wang F, Sellers JR. Load-dependent kinetics of myosin-V can explain its high processivity. *Nat Cell Biol*. 2005;7(9):861-869. doi:10.1038/ncb1287
  49. Preller M, Chinthalapudi K, Martin R, Knölker HJ, Manstein DJ. Inhibition of myosin ATPase

- activity by halogenated pseudilins: A structure-activity study. *J Med Chem.* 2011;54(11):3675-3685. doi:10.1021/jm200259f
50. Chinthalapudi K, Taft MH, Martin R, et al. Mechanism and specificity of pentachloropseudilin-mediated inhibition of myosin motor activity. *J Biol Chem.* 2011;286(34):29700-29708. doi:10.1074/jbc.M111.239210
51. Behrens VA, Münnich S, Adler-Gunzelmann G, et al. The Conserved Lysine-265 Allosterically Modulates Nucleotide- and Actin-binding Site Coupling in Myosin-2. *Sci Rep.* 2017;7(1):1-13. doi:10.1038/s41598-017-07933-y
52. Fujita-Becker S, Reubold TF, Holmes KC. The actin-binding cleft: Functional characterisation of myosin II with a strut mutation. *J Muscle Res Cell Motil.* 2006;27(2):115-123. doi:10.1007/s10974-005-9047-0
53. A. Cammarato, C. Dambacher, A. Knowles, W. Kronert, R. Bodmer, K. Ocorr SB. Myosin Transducer Mutations Differentially Affect Motor Function, Myofibril Structure, and the Performance of Skeletal and Cardiac Muscles. *Coll English.* 2008;19:553-562. doi:10.1091/mbc.E07
54. Meyers MJ, Liu J, Xu J, et al. 4-Aryl pyrrolidines as a novel class of orally efficacious antimalarial agents. Part 1: Evaluation of 4-aryl-N-benzylpyrrolidine-3-carboxamides. *J Med Chem.* 2019:acs.jmedchem.8b01972. doi:10.1021/acs.jmedchem.8b01972
55. Coombs GH, Goldberg DE, Klemba M, Berry C, Kay J, Mottram JC. Aspartic proteases of *Plasmodium falciparum* and other parasitic protozoa as drug targets. *Trends Parasitol.* 2001;17(11):532-537. doi:10.1016/S1471-4922(01)02037-2
56. Dodean RA, Kancharla P, Li Y, et al. Discovery and Structural Optimization of Acridones as Broad-Spectrum Antimalarials. *J Med Chem.* 2019:acs.jmedchem.8b01961. doi:10.1021/acs.jmedchem.8b01961
57. Kelly JX, Smilkstein MJ, Brun R, et al. Discovery of dual function acridones as a new antimalarial chemotype. *Nature.* 2009;459(7244):270-273. doi:10.1038/nature07937
58. Flannery EL, Fidock DA, Winzeler EA. Using genetic methods to define the targets of compounds with antimalarial activity. *J Med Chem.* 2013;56(20):7761-7771. doi:10.1021/jm400325j
59. Paquet T, Lee MCS, Blagborough AM, et al. Antimalarial efficacy of MMV390048, an inhibitor of *Plasmodium* phosphatidylinositol 4-kinase. *Sci Transl Med.* 2017;9(387):eaad9735. doi:10.1126/scitranslmed.aad9735
60. Su X zhuan, Wellems TE. Sequence, transcript characterization and polymorphisms of a *Plasmodium falciparum* gene belonging to the heat-shock protein (HSP) 90 family. *Gene.* 1994;151(1-2):225-230. doi:10.1016/0378-1119(94)90661-0
61. Banumathy G, Singh V, Pavithra SR, Tatu U. Heat shock protein 90 function is essential for *Plasmodium falciparum* growth in human erythrocytes. *J Biol Chem.* 2003;278(20):18336-18345. doi:10.1074/jbc.M211309200
62. Kumar R, Musiyenko A, Barik S. The heat shock protein 90 of *Plasmodium falciparum* and antimalarial activity of its inhibitor, geldanamycin. *Malar J.* 2003;2:1-11. doi:10.1186/1475-2875-2-1

63. Kumar R, Pavithra SR, Tatu U. Three-dimensional structure of heat shock protein 90 from *Plasmodium falciparum*: Molecular modelling approach to rational drug design against malaria. *J Biosci.* 2007;32(3):531-536. doi:10.1007/s12038-007-0052-x
64. Murillo-Solano C, Dong C, Sanchez CG, Pizarro JC. Identification and characterization of the antiplasmodial activity of Hsp90 inhibitors. *Malar J.* 2017;16(1):1-14. doi:10.1186/s12936-017-1940-7
65. Kumarihamy M, Ferreira D, Croom E, et al. Antiplasmodial and Cytotoxic Cytochalasins from an Endophytic Fungus, *Nemania* sp. UM10M, Isolated from a Diseased *Torreya taxifolia* Leaf. *Molecules.* 2019;24(4):777. doi:10.3390/molecules24040777
66. Haider N, Walter RD, Dias S de S, Lüersen K, Eschbach M-L, Gilberger T-W. The spermidine synthase of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: Molecular and biochemical characterisation of the polyamine synthesis enzyme. *Mol Biochem Parasitol.* 2005;142(2):224-236. doi:10.1016/j.molbiopara.2005.04.004
67. Burger PB, Louw AI, Müller IB, et al. A novel inhibitor of *Plasmodium falciparum* spermidine synthase: a twist in the tail. *Malar J.* 2015;14(1):54. doi:10.1186/s12936-015-0572-z
68. Sprenger J, Svensson B, Hålander J, Carey J, Persson L, Al-Karadaghi S. Three-dimensional structures of *Plasmodium falciparum* spermidine synthase with bound inhibitors suggest new strategies for drug design. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr.* 2015;71:484-493. doi:10.1107/S1399004714027011
69. Sprenger J, Carey J, Svensson B, Wengel V, Persson L. Binding and inhibition of spermidine synthase from *Plasmodium falciparum* and implications for in vitro inhibitor testing. *PLoS One.* 2016;11(9):1-17. doi:10.1371/journal.pone.0163442
70. El Bissati K, Redel H, Ting L-M, et al. Novel Synthetic Polyamines Have Potent Antimalarial Activities in vitro and in vivo by Decreasing Intracellular Spermidine and Spermine Concentrations. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9(February):1-9. doi:10.3389/fcimb.2019.00009
71. Hotta CT, Gazarini ML, Beraldo FH, et al. Calcium-dependent modulation by melatonin of the circadian rhythm in malarial parasites. *Nat Cell Biol.* 2000;2(7):466-468. doi:10.1038/35017112
72. Srinivasan V, Mohamed M, Zakaria R, Ahmad AH. Malaria , Anti Malarial Drugs and the Role of Melatonin. 2012:371-379.
73. Srinivasan V, H. Ahmad A, Mohamed M, Zakaria R. Melatonin Effects on *Plasmodium* Life Cycle: New Avenues for Therapeutic Approach. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov.* 2012;6(2):139-147. doi:10.2174/187221412800604635
74. Luthra T, Nayak AK, Bose S, Chakrabarti S, Gupta A, Sen S. Indole based antimalarial compounds targeting the melatonin pathway: Their design, synthesis and biological evaluation. *Eur J Med Chem.* 2019. doi:S0223523419301333
75. Preller M, Manstein D, Kalesse M. Novel means and methods for treating malaria and other parasitic disorders. *Eur Pat Appl.* 2012:1-22.
76. Jorgensen WT, Gulliver DW, Katte TA, et al. SC. *Eur J Med Chem.* 2017. doi:10.1016/j.ejmech.2017.10.059
77. Chiba J, Imura S, Yoneda Y, Watanabe T, Muro F. Synthesis and biological evaluation of

- benzoic acid derivatives as potent , orally active VLA-4 antagonists. *Bioorg Med Chem.* 2007;15:1679-1693. doi:10.1016/j.bmc.2006.12.006
78. Rösecke J, König WA. Constituents of various wood-rotting basidiomycetes. *Phytochemistry.* 2000;54:603-610.
79. Sun H, Zhu L, Yang H, et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Asymmetric total synthesis and identification of tetrahydroproto-berberine derivatives as new antipsychotic agents possessing a dopamine D<sub>1</sub> , D<sub>2</sub> and serotonin 5-HT<sub>1A</sub> multi-action profile. *Bioorg Med Chem.* 2013;21(4):856-868. doi:10.1016/j.bmc.2012.12.016
80. Yokokawa F, Nilar S, Noble CG, et al. Discovery of Potent Non-Nucleoside Inhibitors of Dengue Viral RNA- Dependent RNA Polymerase from a Fragment Hit Using Structure- Based Drug Design. *J Med Chem.* 2016;59:3935-3952. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00143
81. Perez-Rodriguez S, Ortiz MA, Pereira R, Rodrigues-Barrios F, de Lera AR, Piedrafita FJ. European Journal of Medicinal Chemistry Highly twisted adamantyl arotinoids: Synthesis , antiproliferative effects and RXR transactivation profiles. *Eur J Med Chem.* 2009;44:2434-2446. doi:10.1016/j.ejmech.2009.01.011
82. Weckener M. Untersuchungen zum Wirkmechanismus Biphenylbasierter Glideosominhibitoren : Modelloptimierung und Struktur- Wirkungsbeziehungen. 2014.
83. Walliker D, Quakyi IA, Wellem TE, et al. Generic Analysis of the Human Malaria Parasite. *Science (80- ).* 1987;236(4809):1661-1666.
84. Pylypenko O, Sweeney HL, Trabuco LG, et al. Force-producing ADP state of myosin bound to actin. *Proc Natl Acad Sci.* 2016;113(13):E1844-E1852. doi:10.1073/pnas.1516598113
85. Fiser A, Šali A. MODELLER: Generation and Refinement of Homology-Based Protein Structure Models. *Methods Enzymol.* 2003;374:461-491. doi:10.1016/S0076-6879(03)74020-8
86. Coureux PD, Sweeney HL, Houdusse A. Three myosin V structures delineate essential features of chemo-mechanical transduction. *EMBO J.* 2004;23(23):4527-4537. doi:10.1038/sj.emboj.7600458
87. Risal D, Gourinath S, Himmel D, Szent-Györgyi A, Cohen C. Myosin subfragment 1 structures reveal a partially bound nucleotide and a complex salt bridge that helps couple nucleotide and actin binding. *Proc Natl Acad Sci.* 2004;101(24):8930-8935. doi:10.1073/pnas.0403002101
88. Krieger E, Joo K, Lee J, et al. Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8. 2009;77(9):114-122. doi:10.1002/prot.22570
89. Fedorov R, Böhl M, Tsiavaliaris G, et al. The mechanism of pentabromopseudilin inhibition of myosin motor activity. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16(1):80-88. doi:10.1038/nsmb.1542
90. Wesenberg G, Winkelmann D, Rayment I, et al. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science (80- ).* 2006;261(5117):50-58. doi:10.1126/science.8316857
91. Kollmar M, Dürrwang U, Kliche W, Manstein DJ, Kull FJ. Crystal structure of the motor domain of a class-I myosin. *EMBO J.* 2002;21(11):2517-2525. doi:10.1093/emboj/21.11.2517
92. Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, et al. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. *J Comput Chem.* 1998;19(14):1639-

- 1662.
93. Madhavi Sastry G, Adzhigirey M, Day T, Annabhimoju R, Sherman W. Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J Comput Aided Mol Des.* 2013;27(3):221-234. doi:10.1007/s10822-013-9644-8
  94. Harder E, Damm W, Maple J, et al. OPLS3: A Force Field Providing Broad Coverage of Drug-like Small Molecules and Proteins. *J Chem Theory Comput.* 2016;12(1):281-296. doi:10.1021/acs.jctc.5b00864
  95. Fisher AJ, Smith CA, Holden HM, et al. X-ray Structures of the Myosin Motor Domain of Dictyostelium discoideum Complexed with MgADP.cntdot.BeFx and MgADP.cntdot.AIF4-. *Biochemistry.* 2005;34(28):8960-8972. doi:10.1021/bi00028a004
  96. Phillips JC, Braun R, Wang W, et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem.* 2005;26(16):1781-1802. doi:10.1002/jcc.20289
  97. MacKerell AD, Bashford D, Bellott M, et al. All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins †. *J Phys Chem B.* 1998;102(18):3586-3616. doi:10.1021/jp973084f
  98. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys.* 1983;79(2):926-935. doi:10.1063/1.445869
  99. Darden T, York D, Pedersen L. Particle mesh Ewald: An N -log(N) method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys.* 1993;98:10089-10092. doi:10.1063/1.464397
  100. Vanommeslaeghe K, Hatcher E, Acharya C, et al. CHARMM General Force Field (CGenFF): A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *J Comput Chem.* 2010;31(4):671-690. doi:10.1002/jcc.21367.CHARMM
  101. Miao Y, Sinko W, Pierce L, Bucher D, Walker RC, McCammon JA. Improved reweighting of accelerated molecular dynamics simulations for free energy calculation. *J Chem Theory Comput.* 2014;10(7):2677-2689. doi:10.1021/ct500090q
  102. Mazzolini R, Dopeso H, Mateo-Lozano S, et al. Brush border Myosin Ia has tumor suppressor activity in the intestine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109:1530-1535. doi:10.1073/pnas.1108411109
  103. Almlöf M, Carlsson J, Åqvist J. Improving the accuracy of the linear interaction energy method for solvation free energies. *J Chem Theory Comput.* 2007;3(6):2162-2175. doi:10.1021/ct700106b
  104. Molander G, Trice S, Kennedy S. Scope of the Two-Step, One-Pot Palladium-Catalyzed Borylation/ Suzuki Cross-Coupling Reaction Utilizing Bis-Boronic Acid. *J Org Chem.* 2012;77(19):8678-8688. doi:10.1056/NEJMcibr1012075.Rosiglitazone
  105. Ankner T, Hilmersson G. Instantaneous deprotection of tosylamides and esters with Sml<sub>2</sub>/amine/water. *Org Lett.* 2009;11(3):503-506. doi:10.1021/ol802243d
  106. Jempty TC, Miller LL, Mazur Y. Oxidative Coupling Reactions Using Silica-Bound Ferric Chloride. *J Org Chem.* 1980;45(4):749-751. doi:10.1021/jo01292a051
  107. Jempty TC, Gogins KAZ, Mazur Y, Miller LL. Iron trichloride/silicon dioxide reacts as oxidant or Lewis acid with phenol ethers. *J Org Chem.* 1981;46:4545-4551. doi:10.1021/jo00335a045

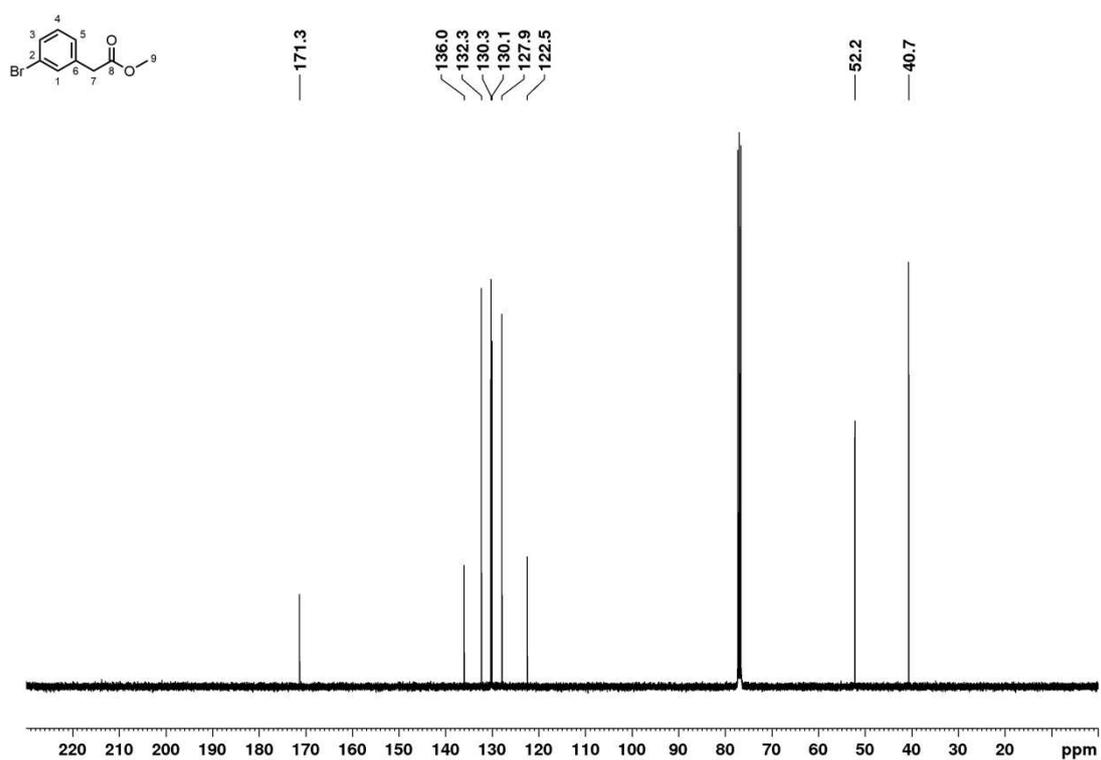
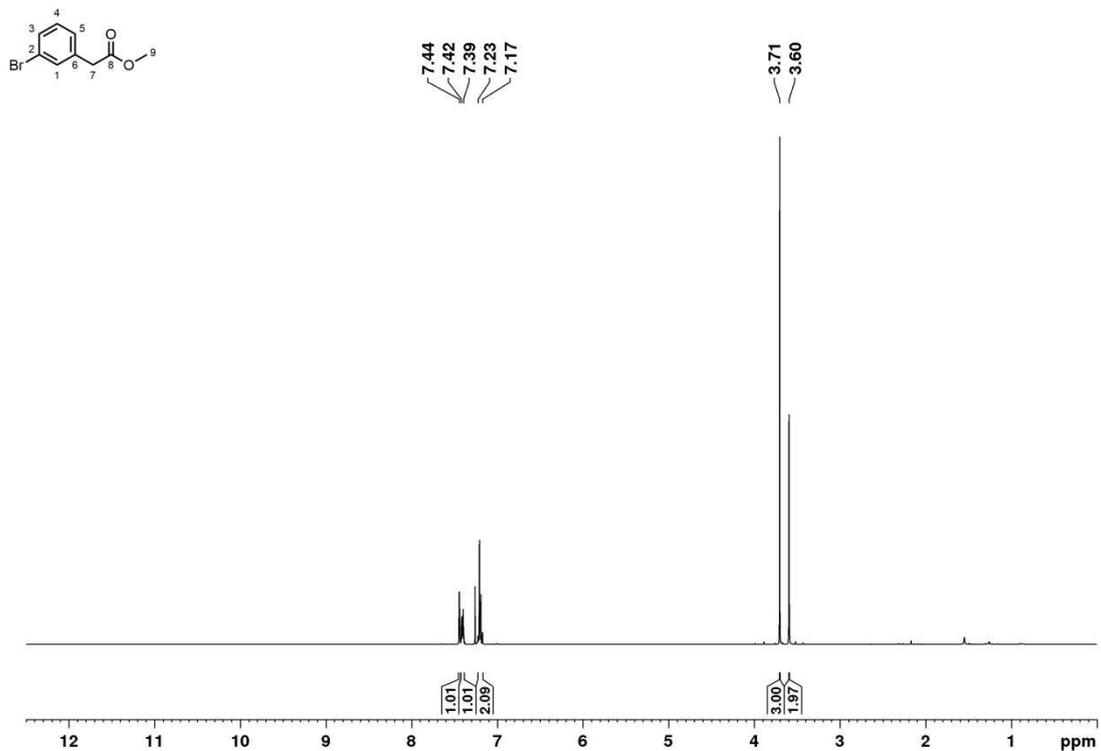
108. Guitierrez-de-Teran H, Aquist J. Linear Interaction Energy: Method and Applications in Drug Design. *Comput Drug Discov Des.* 2012;819. doi:10.1007/978-1-61779-465-0
109. Marmolejo-Murillo LG, Aréchiga-Figueroa IA, Moreno-Galindo EG, et al. Chloroquine blocks the Kir4.1 channels by an open-pore blocking mechanism. *Eur J Pharmacol.* 2017;800(October 2016):40-47. doi:10.1016/j.ejphar.2017.02.024
110. Slater A. CHLOROQUINE: MECHANISM OF DRUG ACTION AND RESISTANCE IN PLASMODIUM FALCIPARUM. *Pharmac Ther.* 1993;57:203-235. doi:10.1016/B978-008055232-3.61444-8
111. Yang Y, Gourinath S, Kovács M, et al. Rigor-like Structures from Muscle Myosins Reveal Key Mechanical Elements in the Transduction Pathways of This Allosteric Motor. *Structure.* 2007;15(5):553-564. doi:10.1016/j.str.2007.03.010
112. Walker JW, Reid GP, McCray JA, Trentham DR. Photolabile 1-(2-Nitrophenyl)ethyl Phosphate Esters of Adenine Nucleotide Analogues. Synthesis and Mechanism of Photolysis. *J Am Chem Soc.* 1988;110(21):7170-7177. doi:10.1021/ja00229a036
113. Weiss S, Chizhov I, Geeves MA. A flash photolysis fluorescence/light scattering apparatus for use with sub microgram quantities of muscle proteins. *J Muscle Res Cell Motil.* 2000;21(5):423-432. doi:10.1023/A:1005690106951
114. Manstein D, Fedorov R, Tsiavaliaris G, et al. *Means for Treating Myosin-Related Diseases.* Vol 2009.; 2009.
115. Fedrov R, Boehl M, Tsiavaliaris G, et al. Crystal Structure of Myosin-2 Motor Domain in Complex with Adp-Metavanadate and Pentachlorocarbazole. *TO BE Publ.* doi:10.2210/PDB2X9H/PDB
116. Allingham JS, Smith R, Rayment I. The structural basis of blebbistatin inhibition and specificity for myosin II. *Nat Struct Mol Biol.* 2005;12(4):378-379. doi:10.1038/nsmb908
117. Martin R, Jäger A, Bohl M, et al. Total synthesis of pentabromo- and pentachloropseudilin, and synthetic analogues-allosteric inhibitors of myosin ATPase. *Angew Chemie - Int Ed.* 2009;48(43):8042-8046. doi:10.1002/anie.200903743
118. Singh VK, Coumar MS. Ensemble-based virtual screening: identification of a potential allosteric inhibitor of Bcr-Abl. *J Mol Model.* 2017;23(7). doi:10.1007/s00894-017-3384-y
119. Durrant JD, Oliveira CF, McCammon JA. POVME: An Algorithm for Measuring Binding-Pocket Volumes. 2010;29(5):773-776. doi:10.2217/FON.09.6.Dendritic
120. Navarro O, Kaur H, Mahjoor P, Nolan SP. Cross-Coupling and Dehalogenation Reactions Catalyzed by (N-Heterocyclic carbene)Pd(allyl)Cl Complexes. *J Org Chem.* 2004;69(9):3173-3180. doi:10.1021/jo035834p
121. Jedinák L, Zátoková R, Zemánková H, Šustková A, Cankař P. The Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reaction of Halogenated Aminopyrazoles: Method Development, Scope, and Mechanism of Dehalogenation Side Reaction. *J Org Chem.* 2017;82(1):157-169. doi:10.1021/acs.joc.6b02306
122. Deangelis AJ, Gildner PG, Chow R, Colacot TJ. Generating Active L-Pd(0) via Neutral or Cationic  $\pi$ -Allylpalladium Complexes Featuring Biaryl/Bipyrazolylphosphines: Synthetic, Mechanistic, and Structure-Activity Studies in Challenging Cross-Coupling Reactions. *J Org*

- Chem.* 2015;80(13):6794-6813. doi:10.1021/acs.joc.5b01005
123. Denmark SE, Baird JD, Regens CS. Palladium-catalyzed cross-coupling of five-membered heterocyclic silanolates. *J Org Chem.* 2008;73(4):1440-1455. doi:10.1021/jo7023784
124. Barham J, Coulthard G, Emery K, et al. KO t Bu: A Privileged Reagent for Electron Transfer Reactions? *J Am Chem Soc.* 2016;138(23):7402-7410. doi:10.1021/jacs.6b03282
125. Schrag JD, Cygler M. Lipases and alpha/beta hydrolase fold. *Methods Enzymol.* 1997;284(1973):85-107. doi:10.1016/S0076-6879(97)84006-2
126. Beeson JG, Drew DR, Boyle MJ, Feng G, Fowkes FJI, Richards JS. Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. *FEMS Microbiol Rev.* 2016;40(3):343-372. doi:10.1093/femsre/fuw001

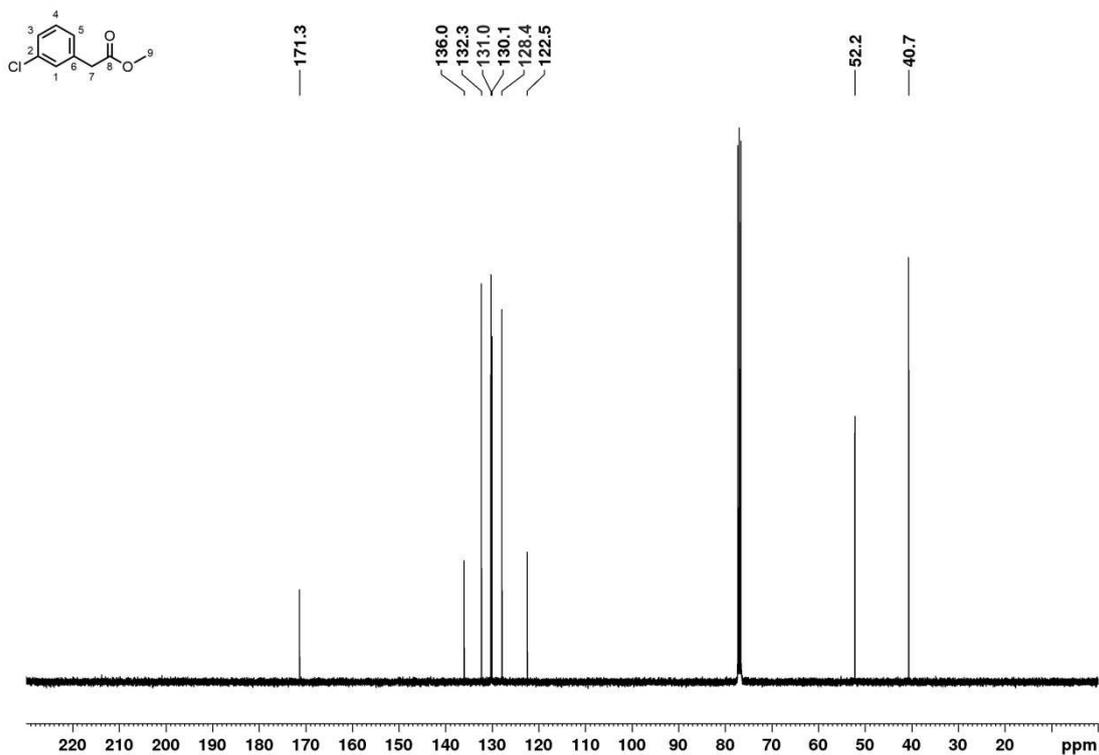
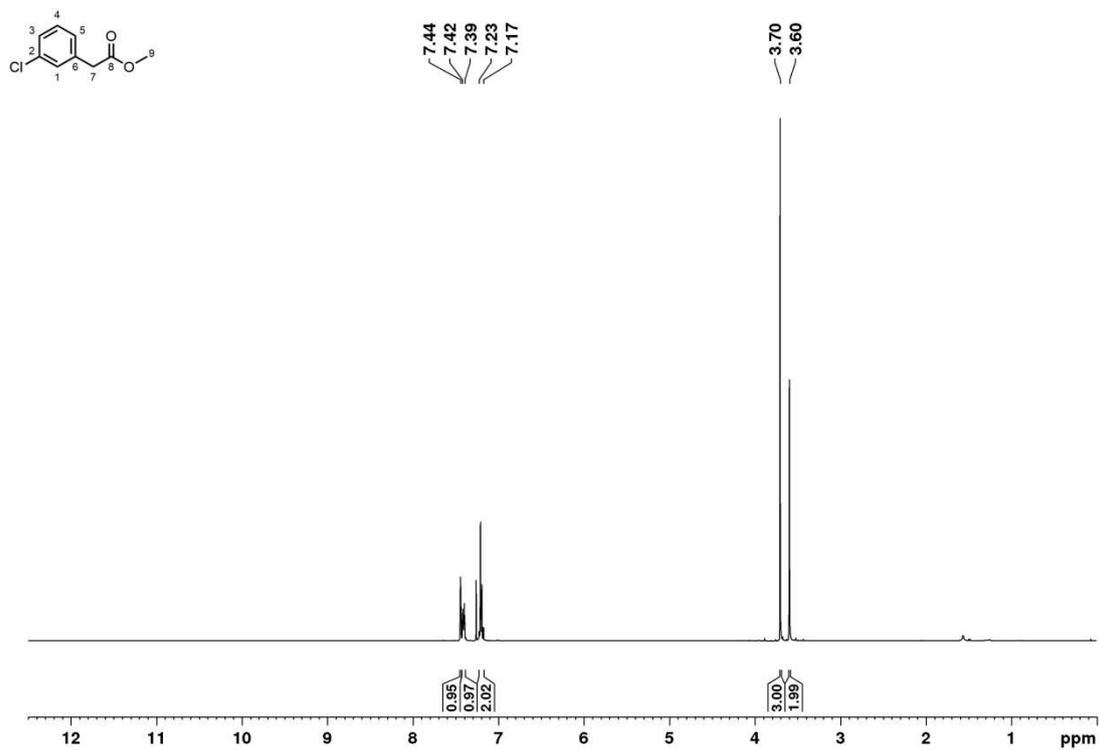
## 7 Anhang

### 7.1 NMR-Spektren

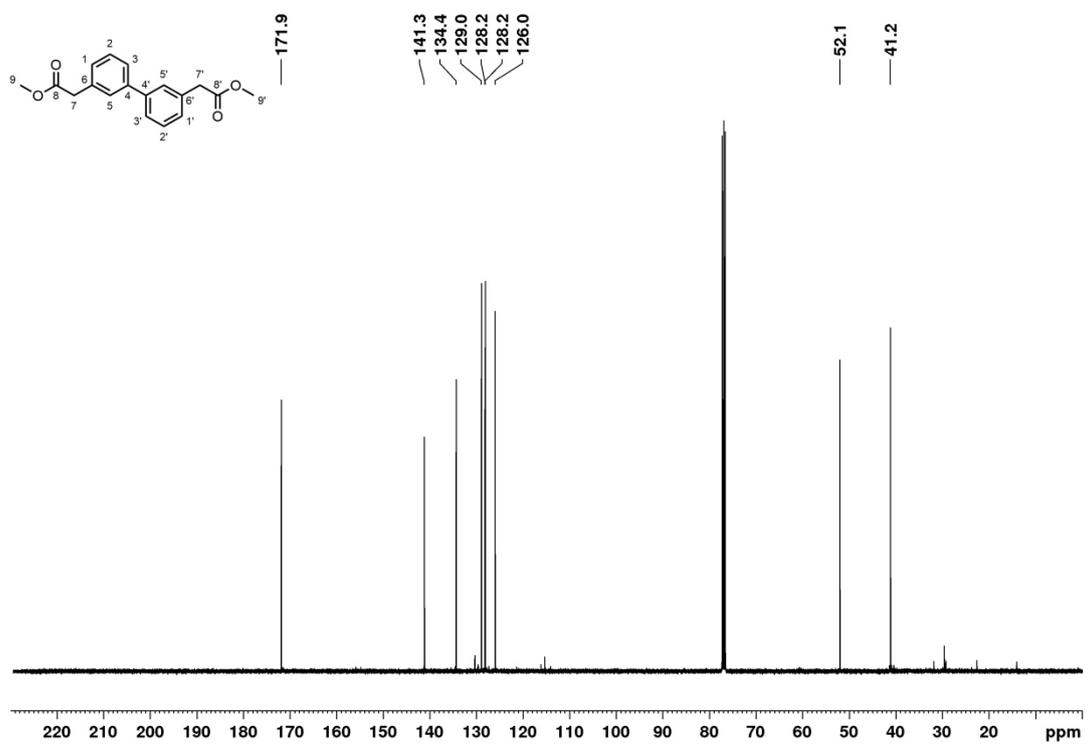
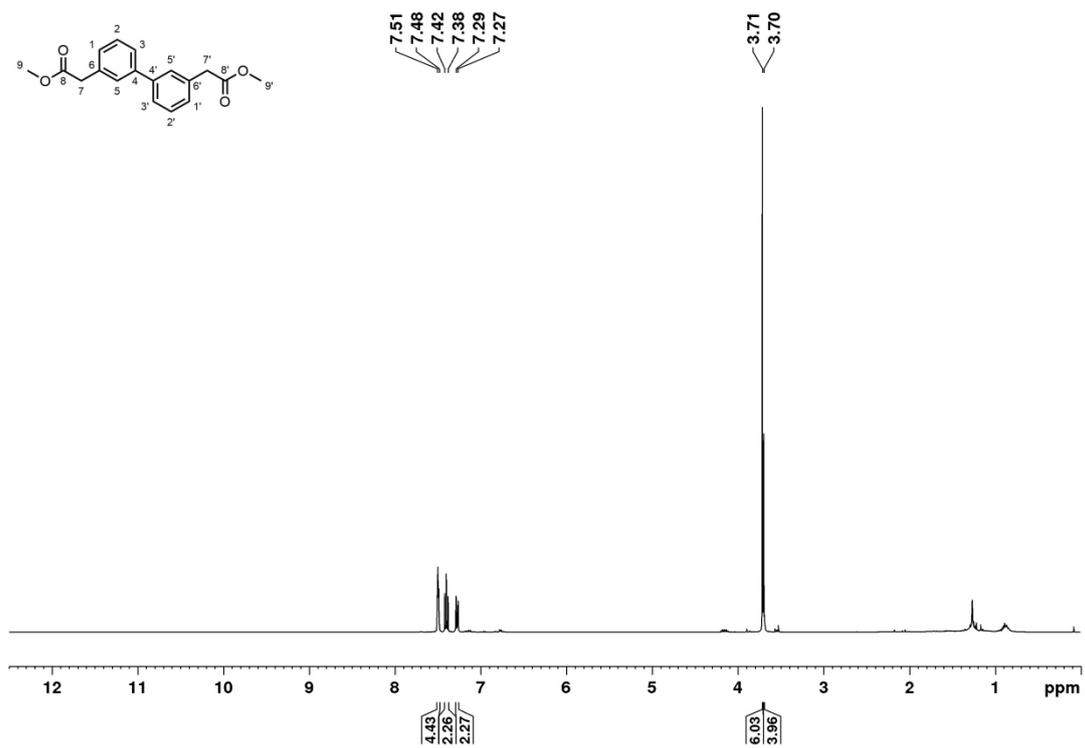
#### Methyl-2-(3-bromophenyl)acetat (1)



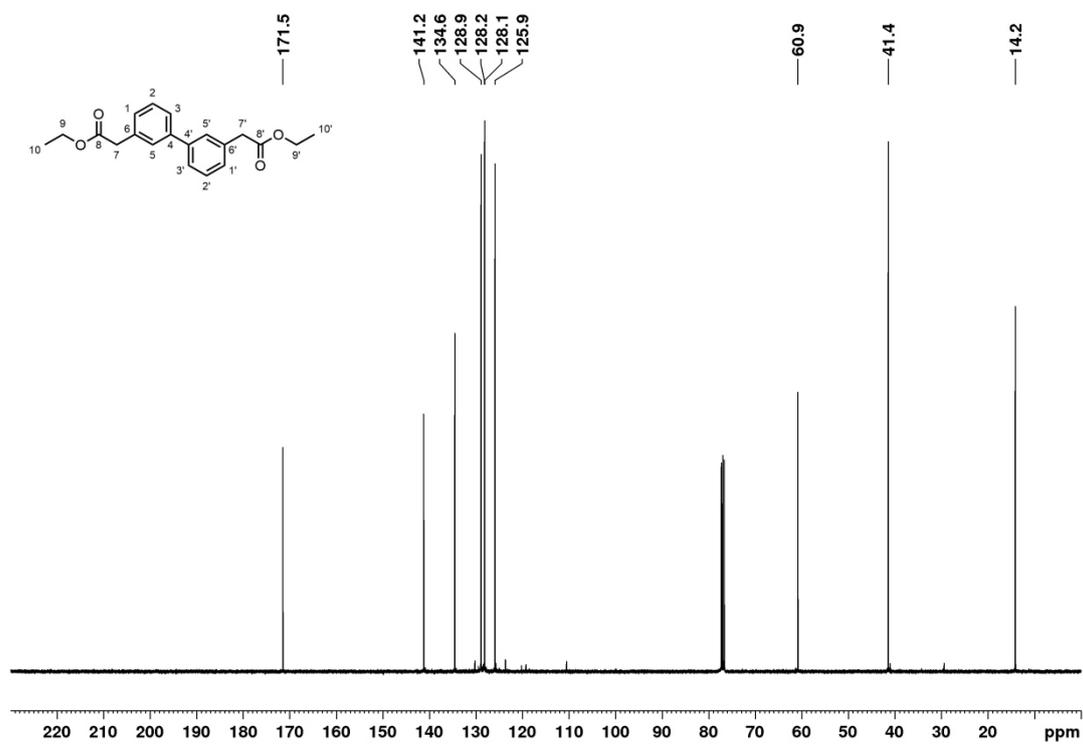
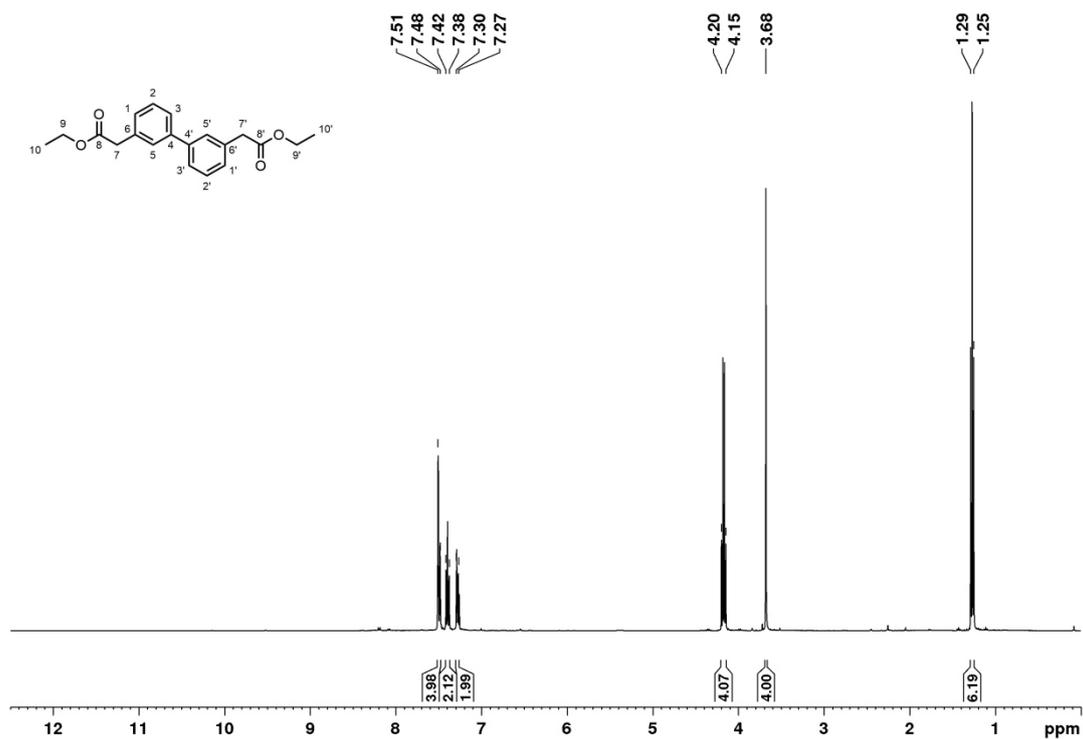
## Methyl-2-(3-chlorophenyl)acetat (3)



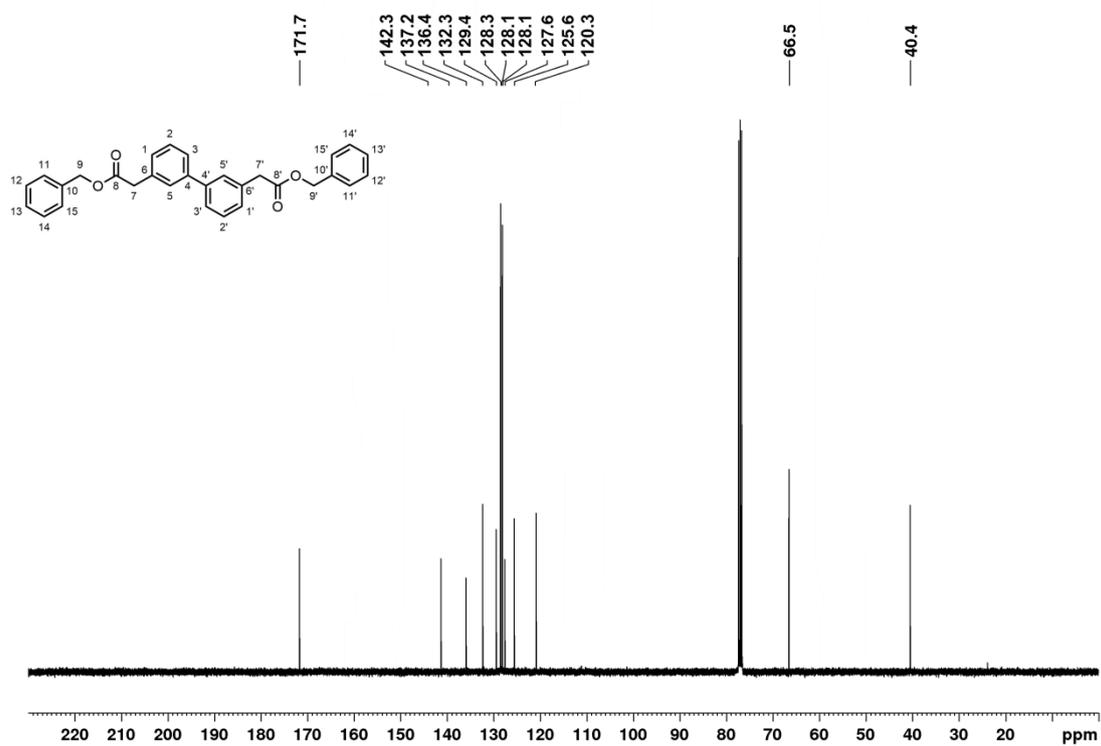
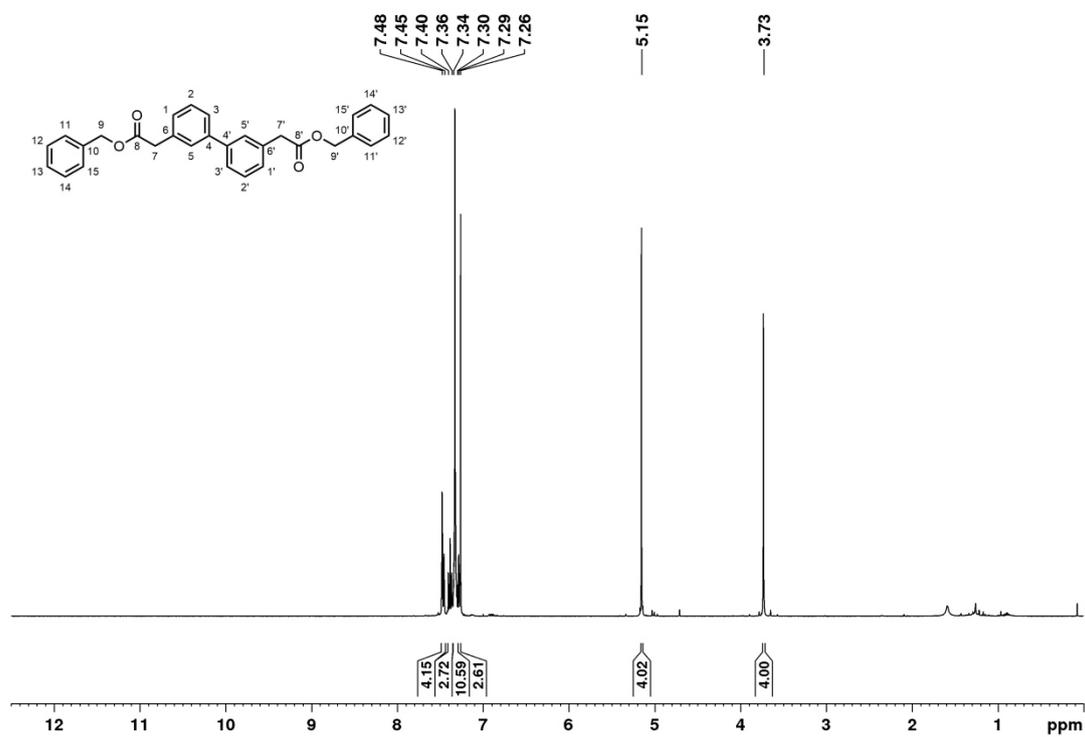
## Dimethyl-2,2'-([1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (5)



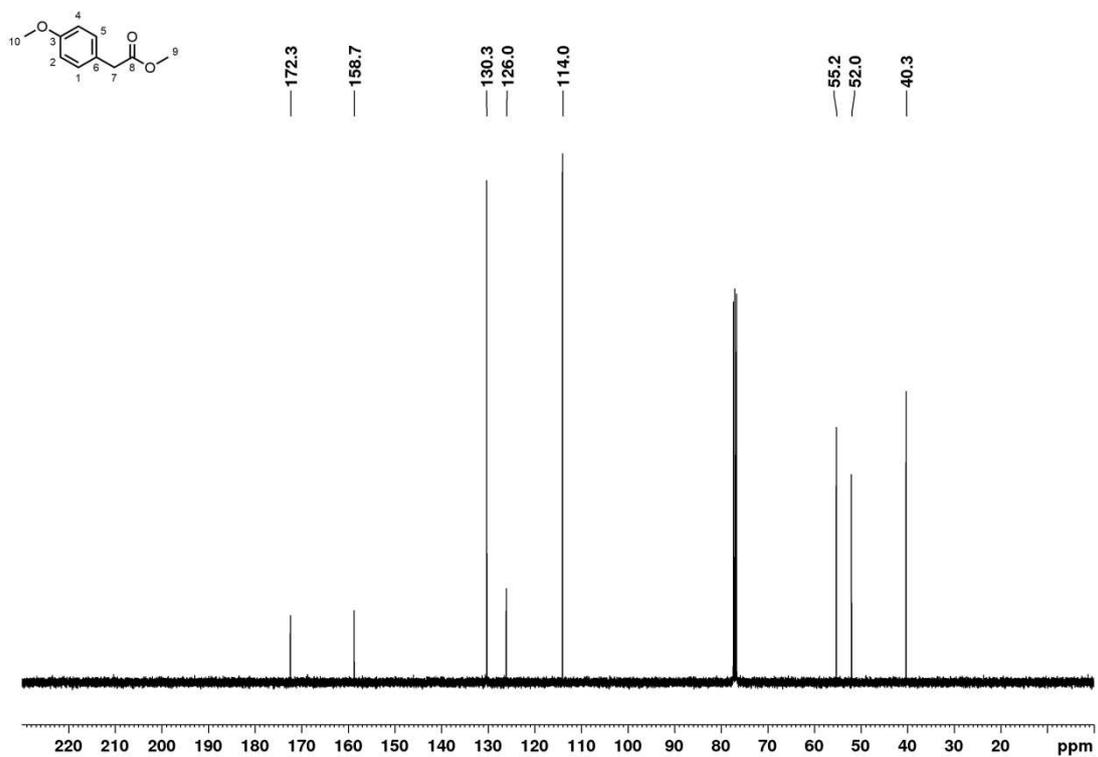
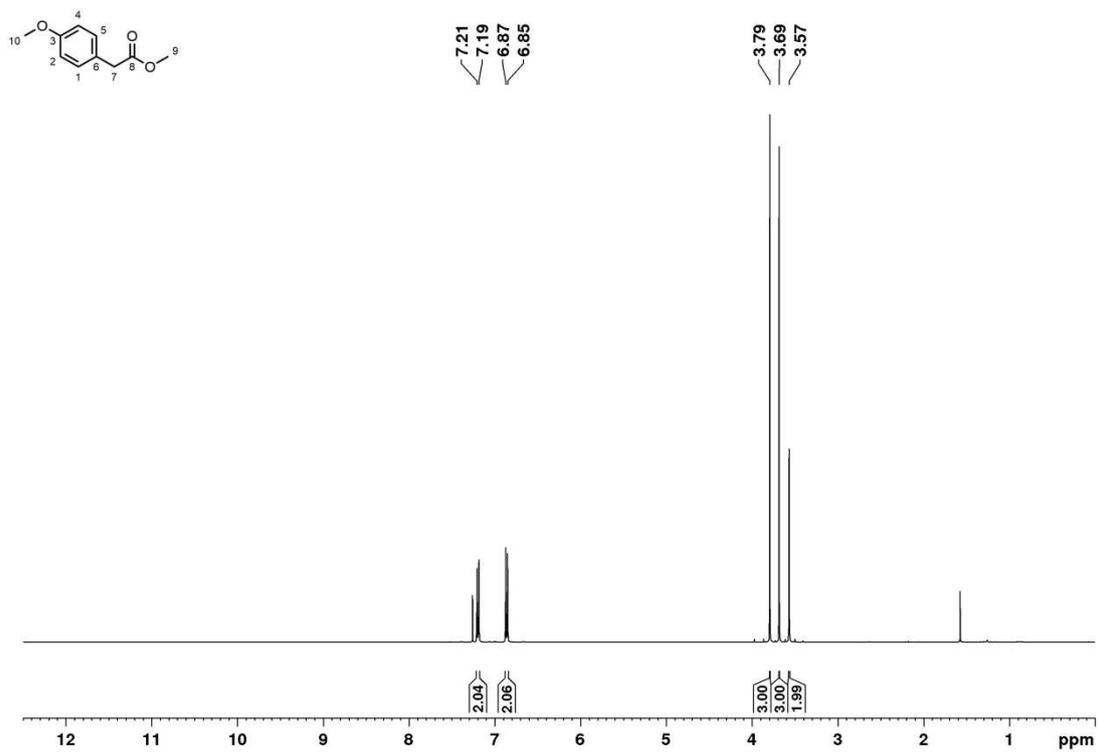
## Diethyl-2,2'-([1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (6)



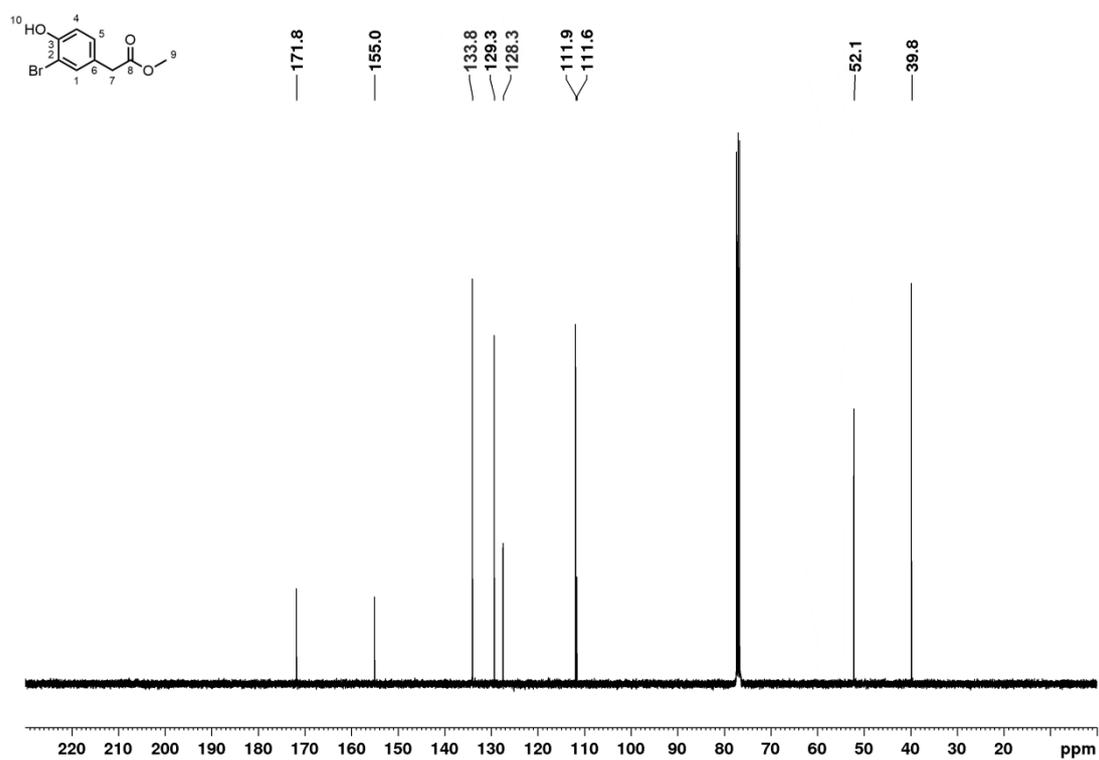
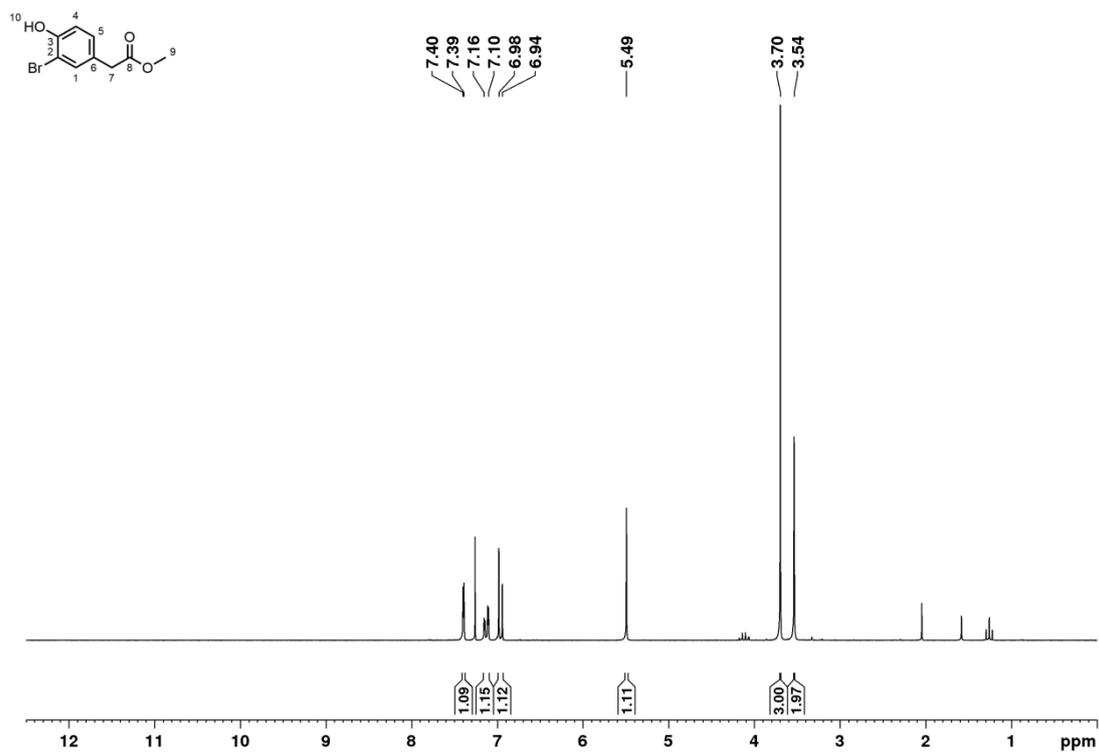
## Dibenzyl-2,2'-([1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (7)



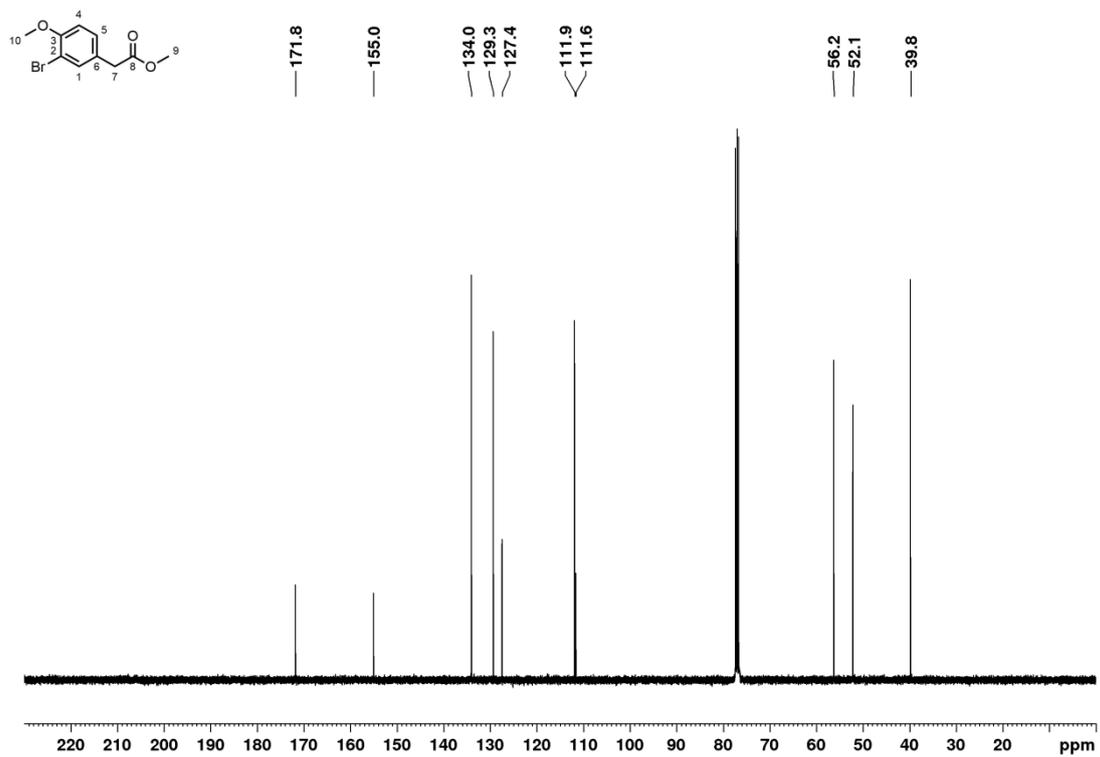
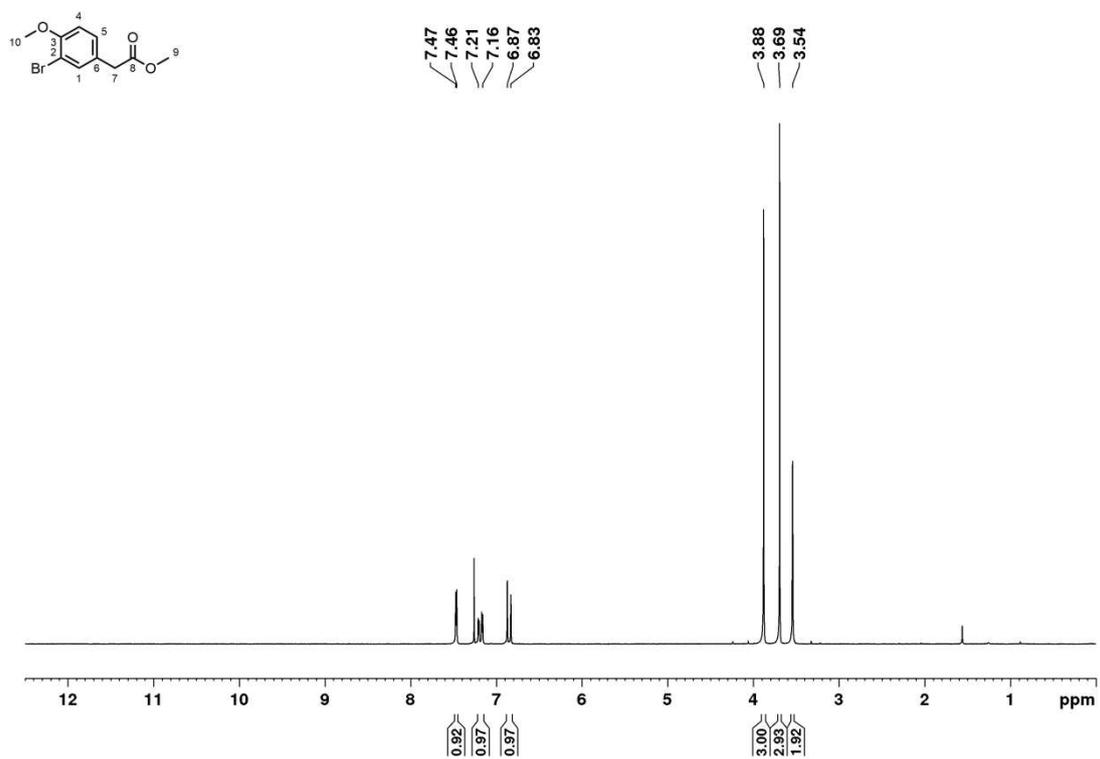
## Methyl-2-(4-methoxyphenyl)acetat (8)



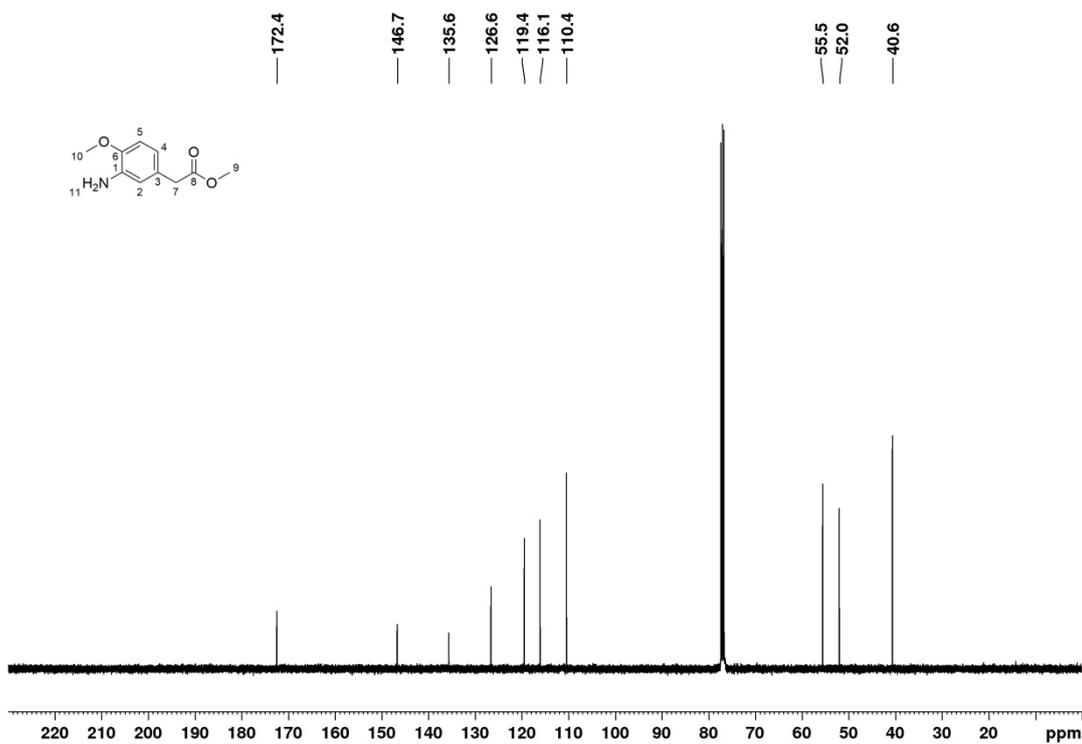
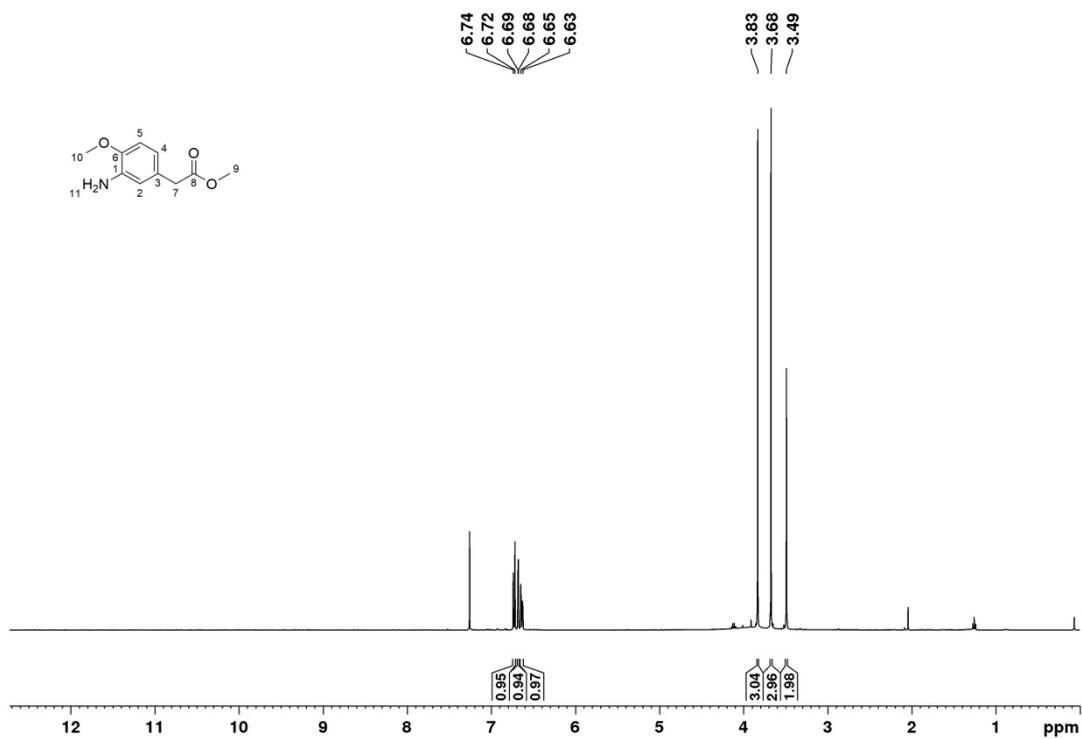
## Methyl-2-(3-bromo-4-hydroxyphenyl)acetat (10)



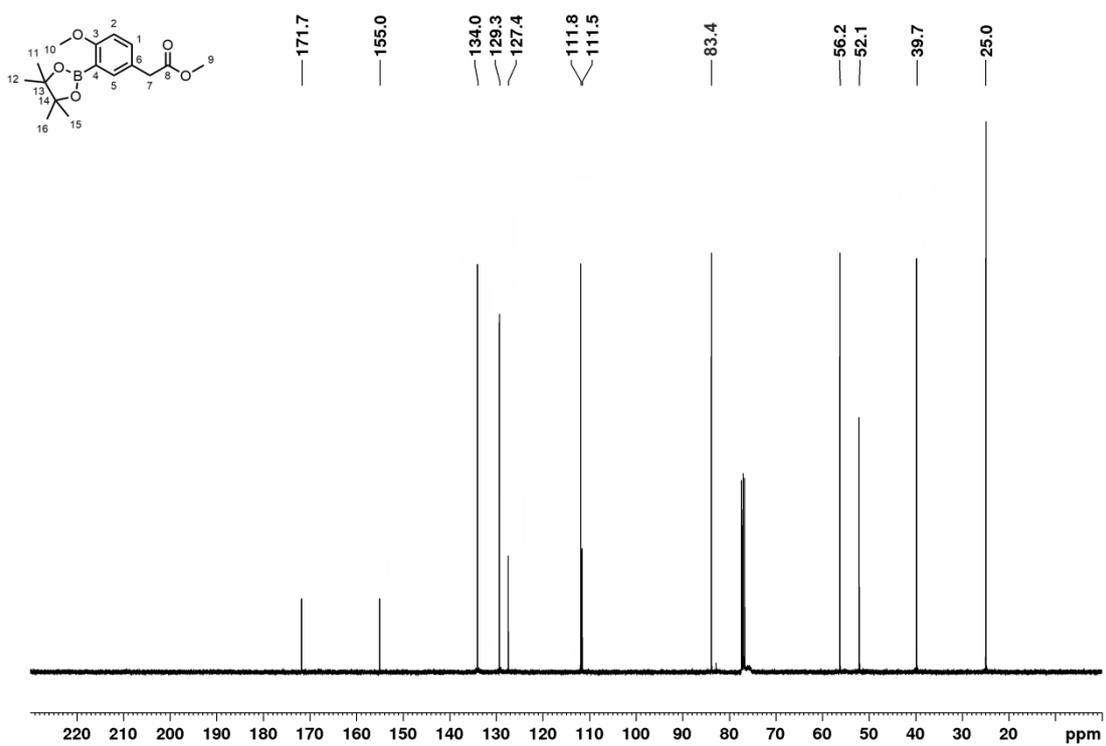
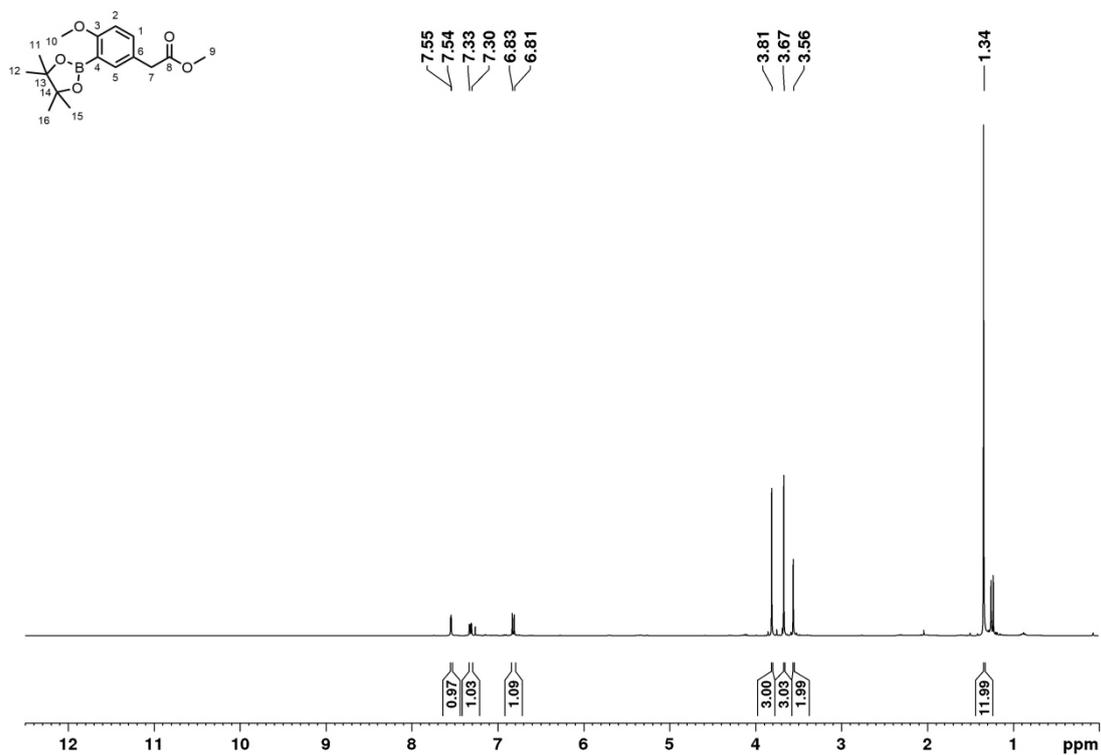
## Methyl-2-(3-bromo-4-methoxyphenyl)acetat (11)



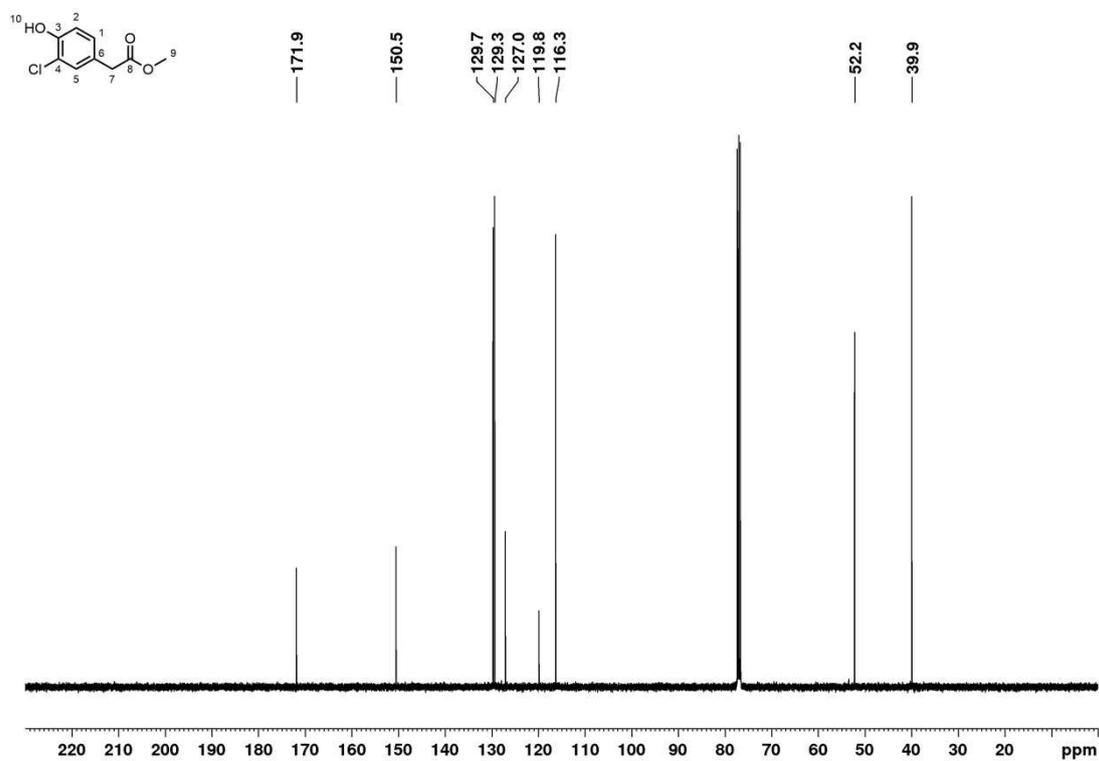
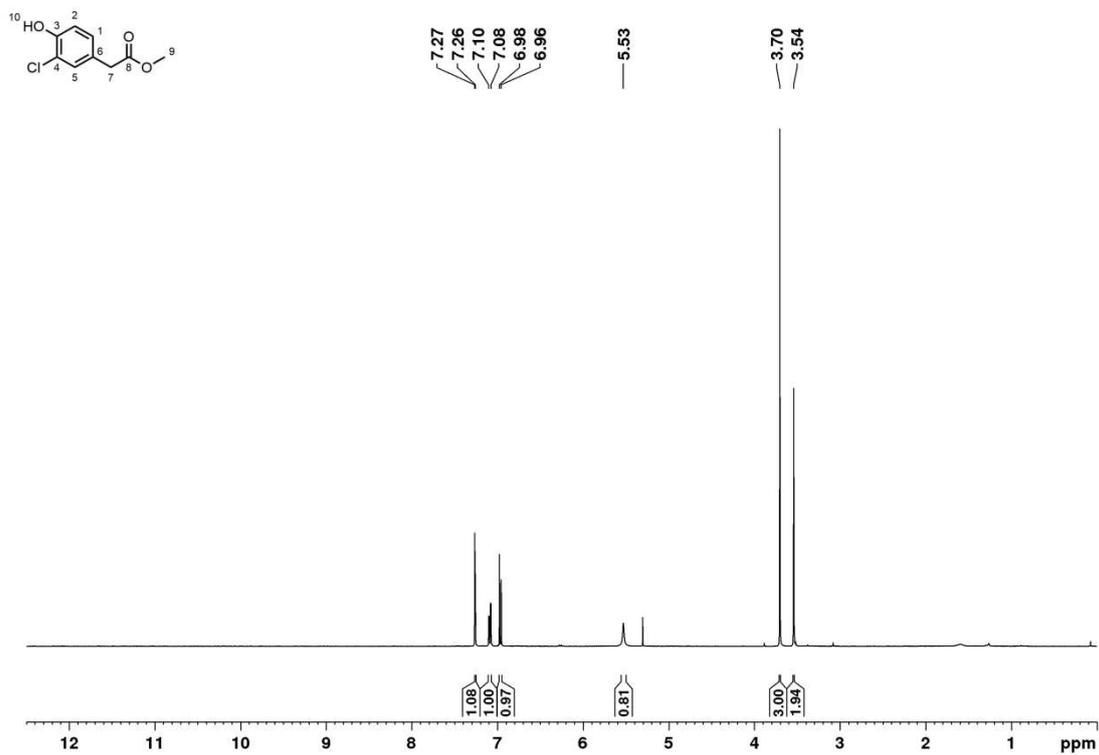
## Methyl-2-(3-amino-4-methoxyphenyl)acetat (44)



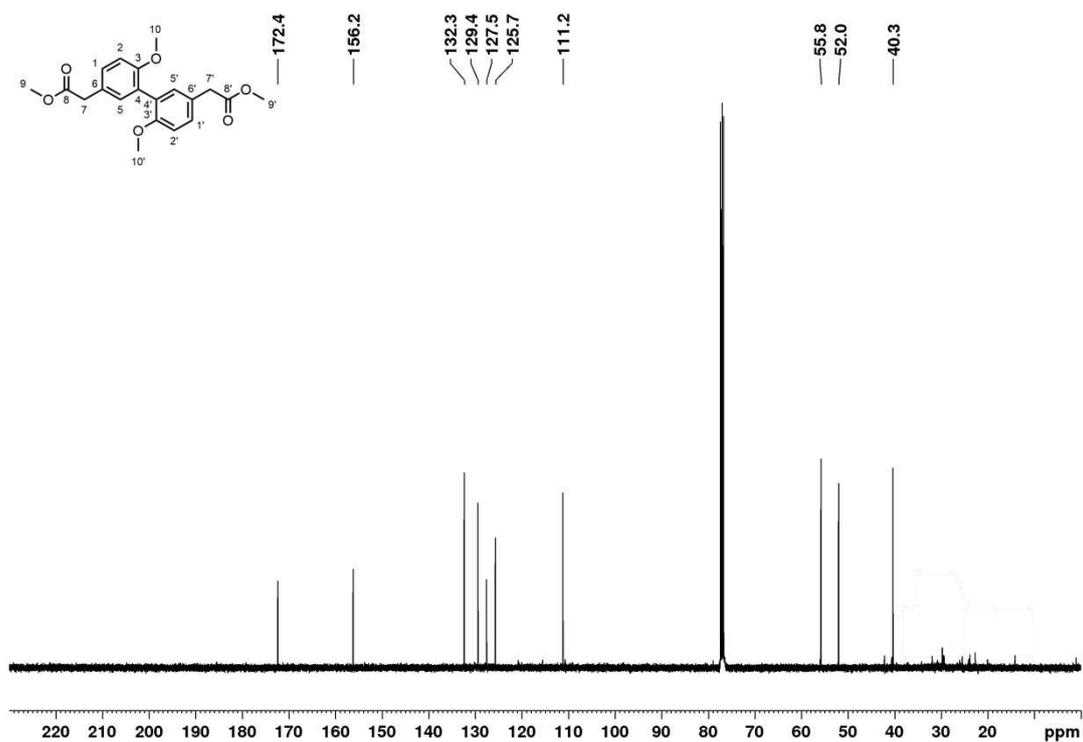
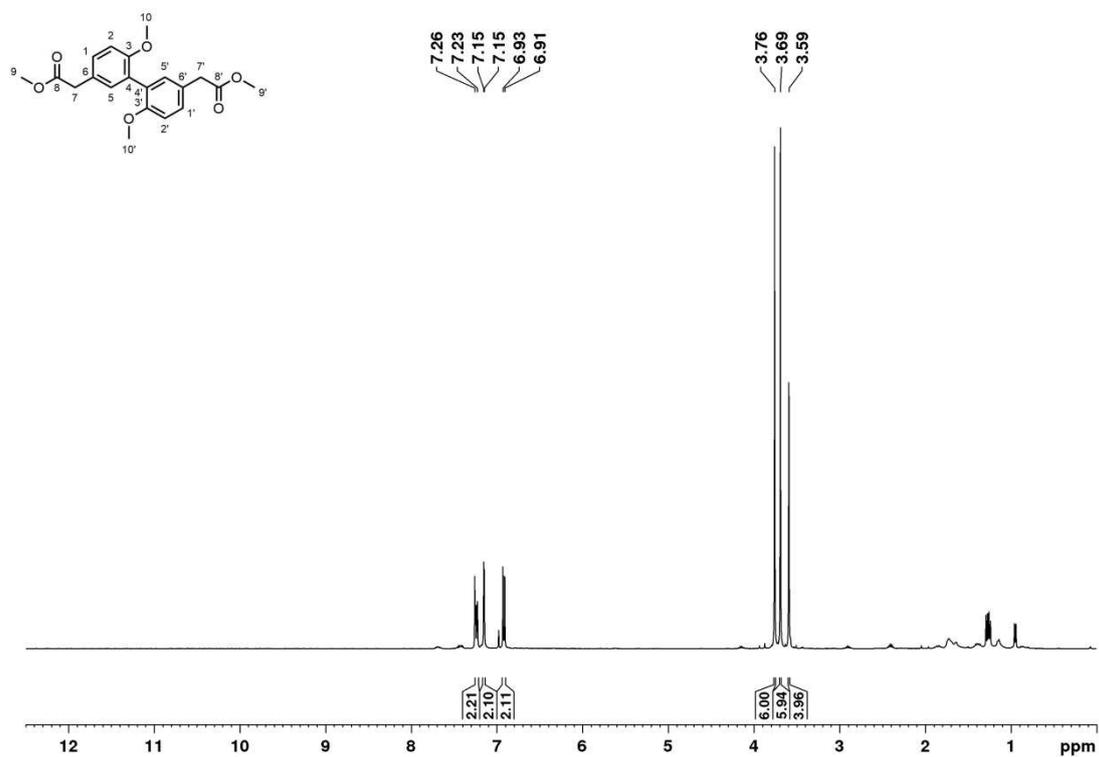
## Methyl-2-(4-methoxy-3-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)acetat (12)



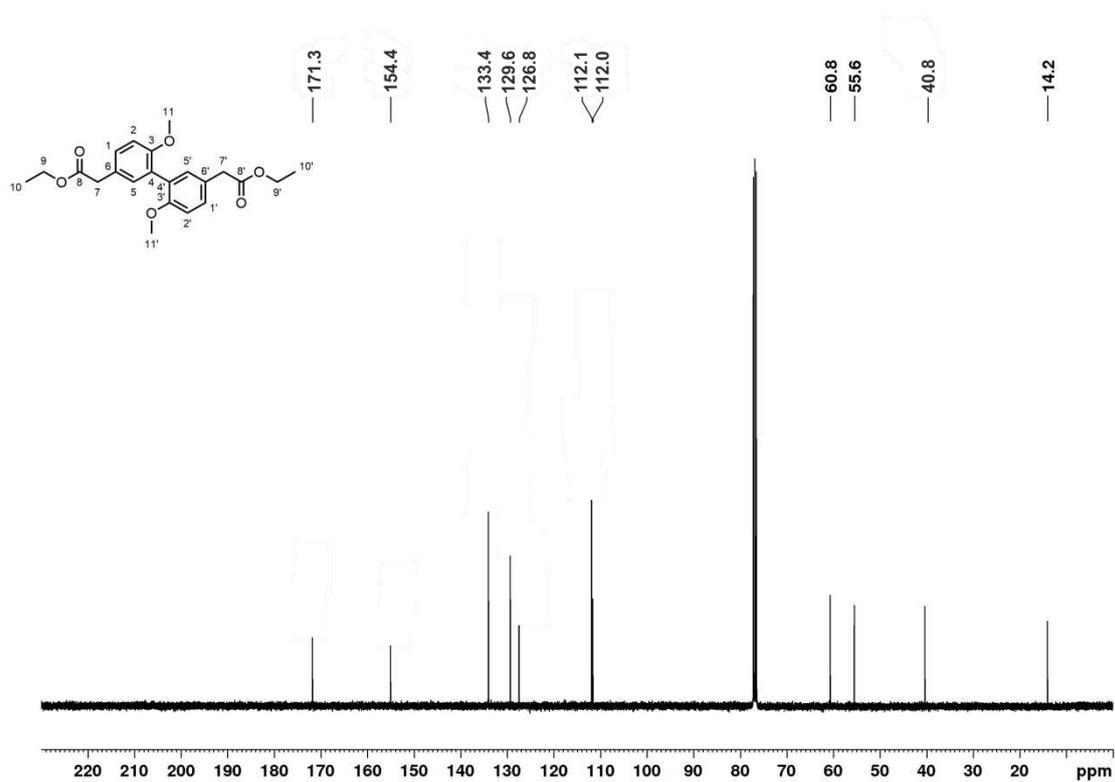
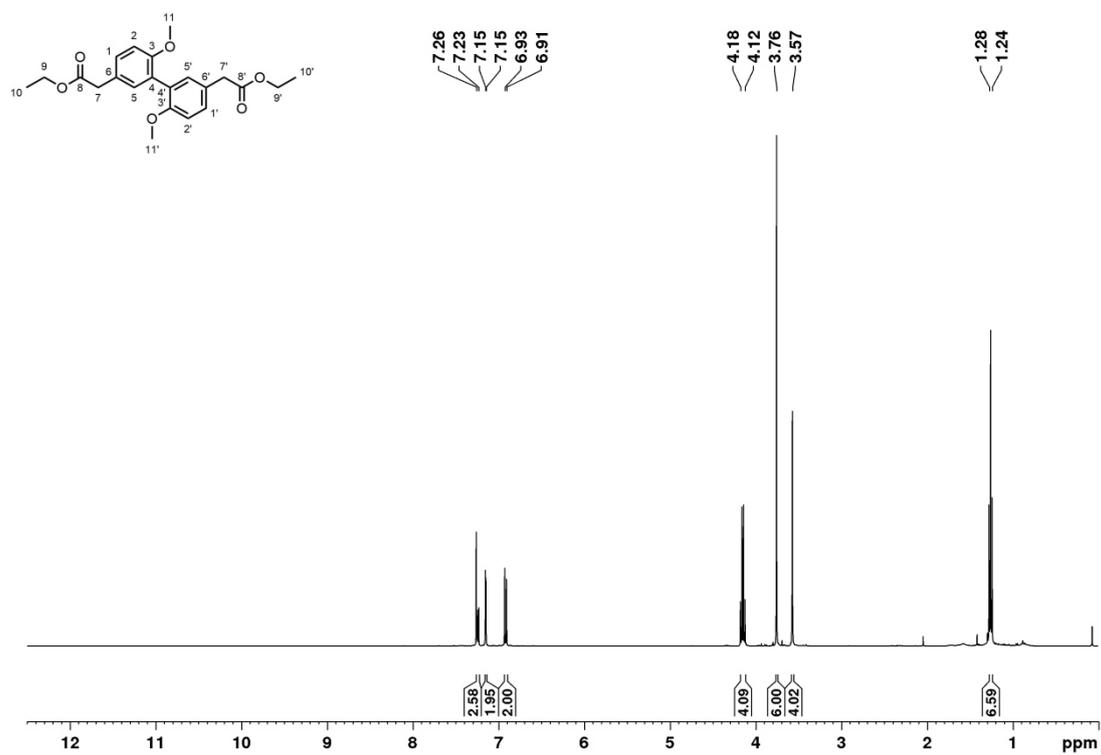
## Methyl-2-(3-chloro-4-hydroxyphenyl)acetat (14)



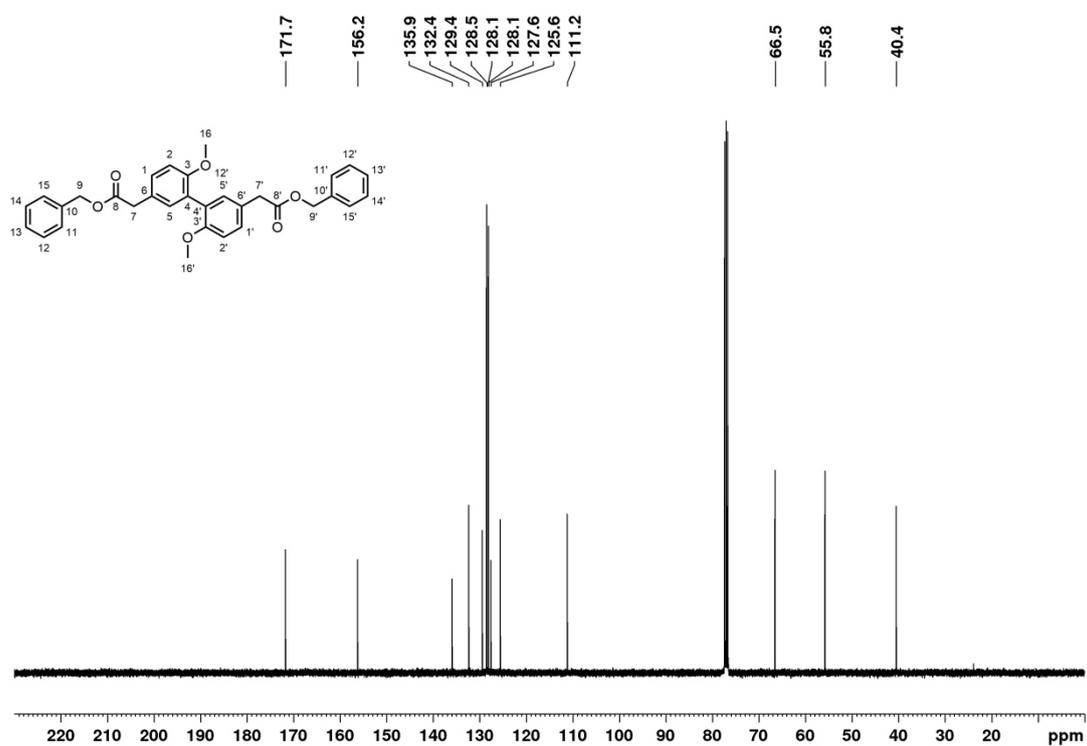
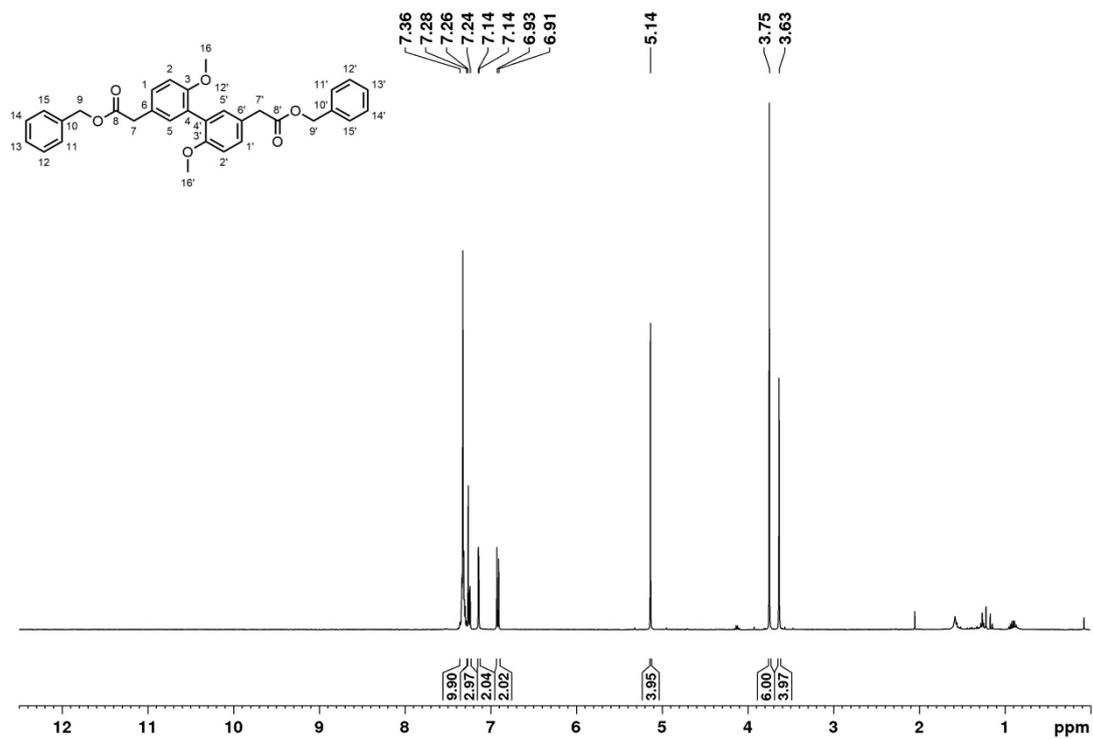
## Dimethyl-2,2'-(6,6'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (15)



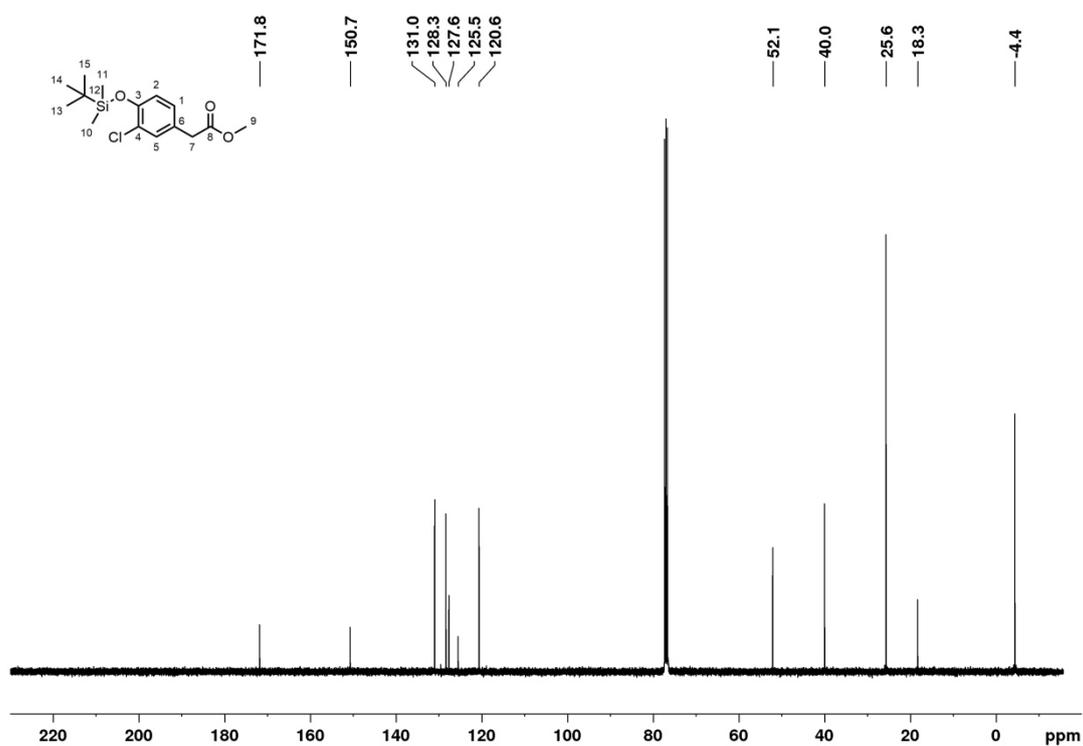
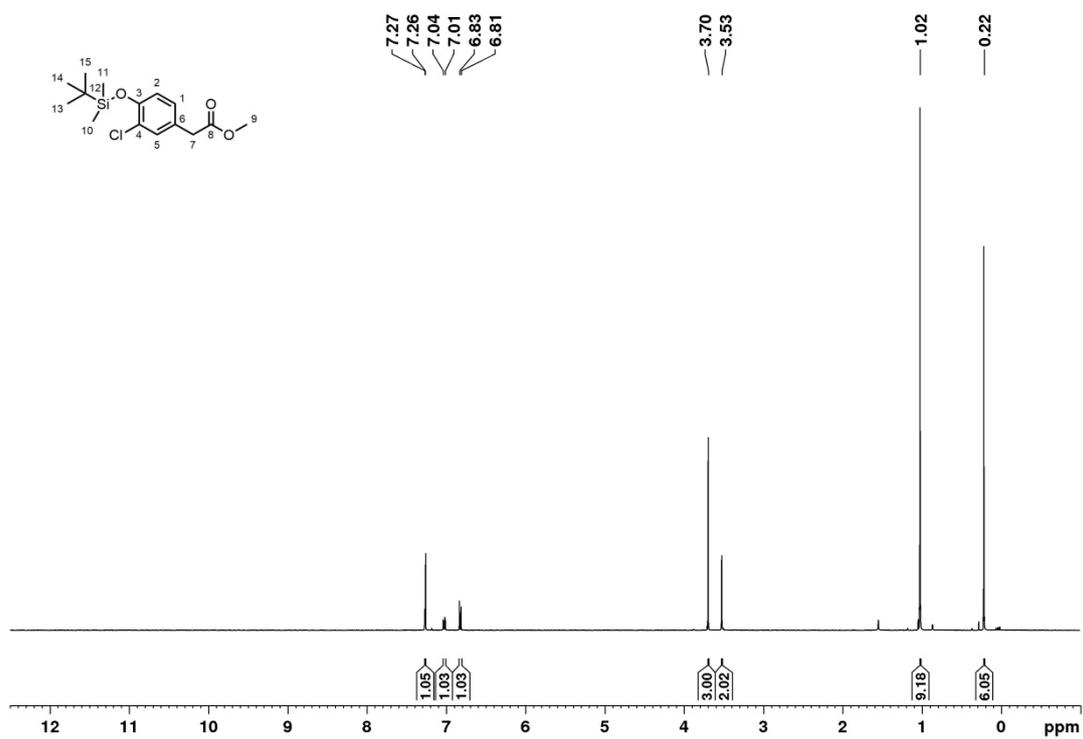
## Diethyl-2,2'-(6,6'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (16)



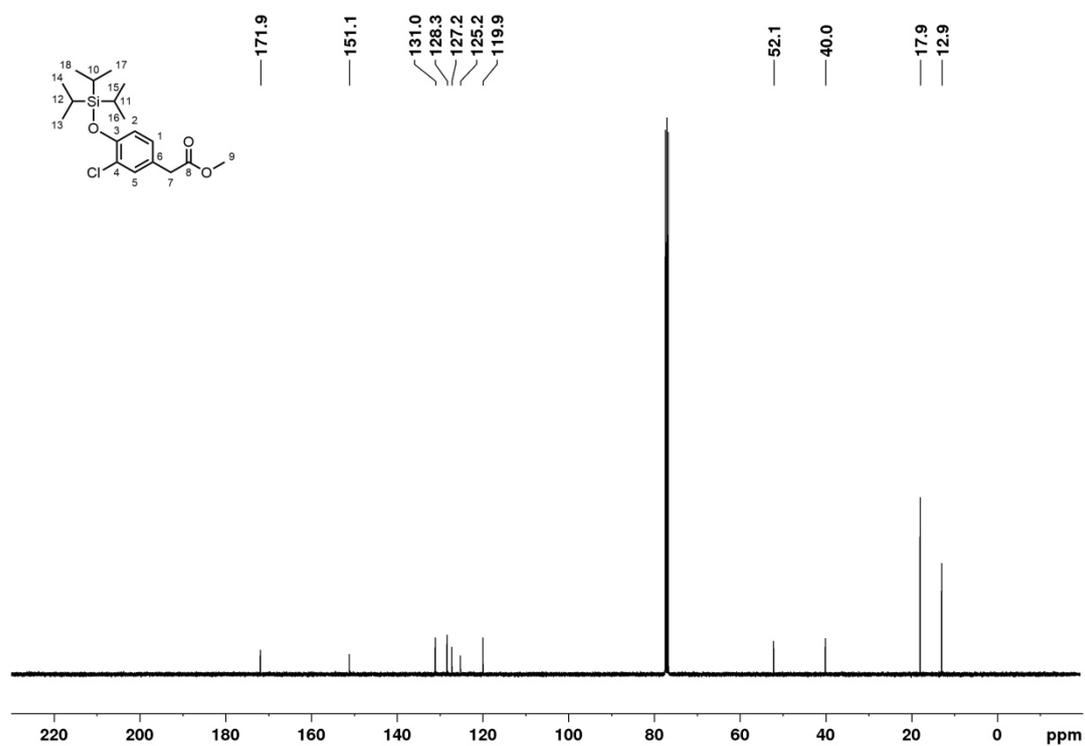
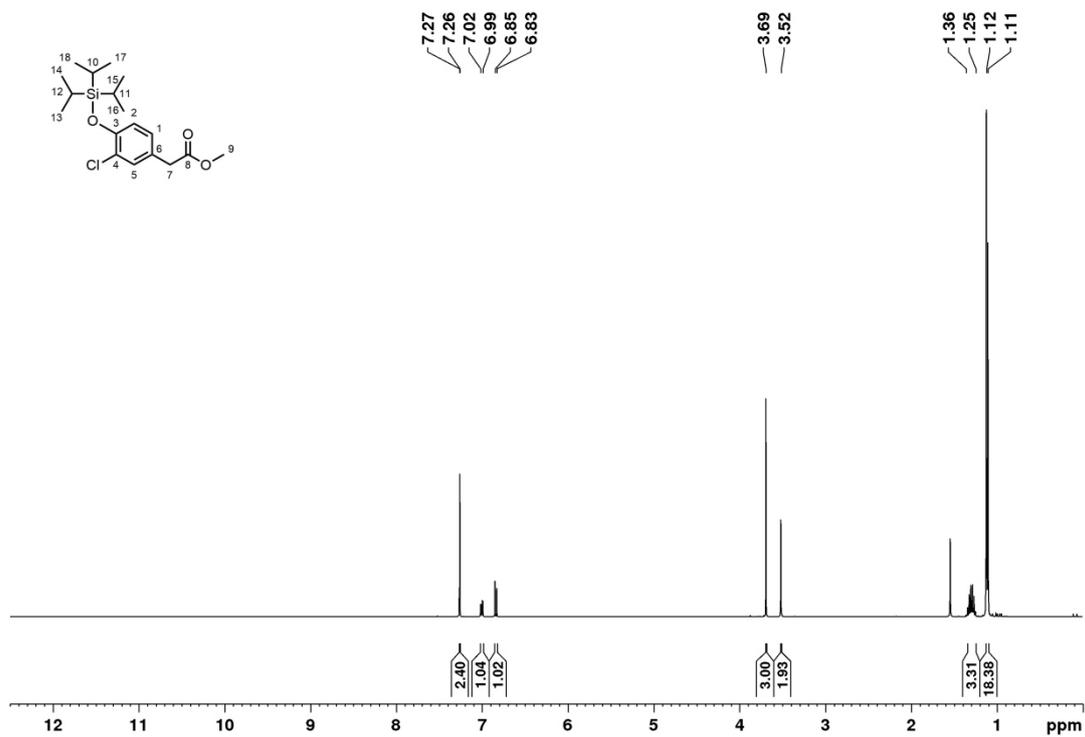
## Dibenzyl-2,2'-(6,6'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (17)



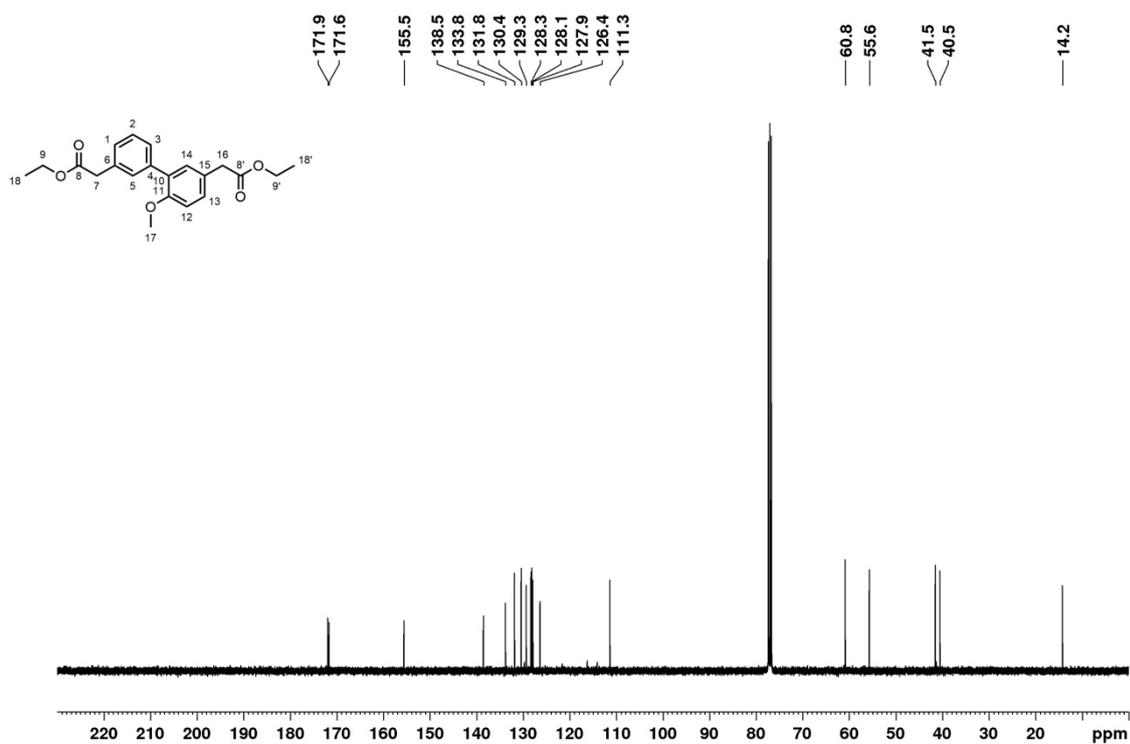
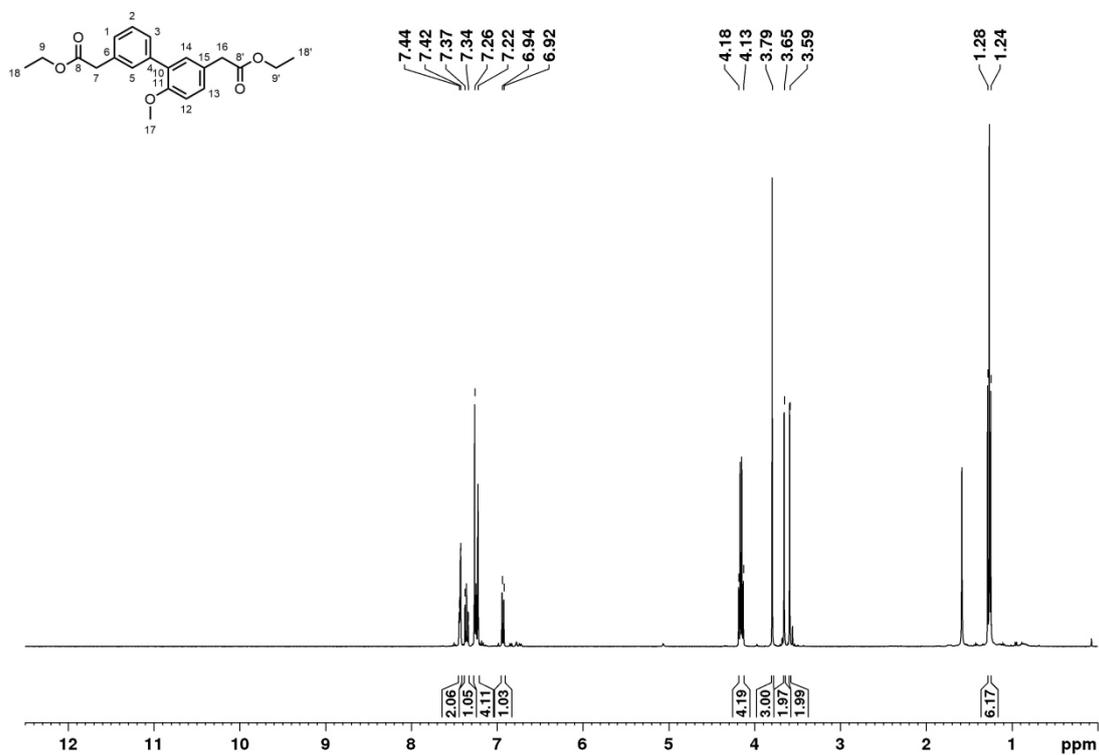
## Methyl-2-(3-chloro-4-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)acetat (20)



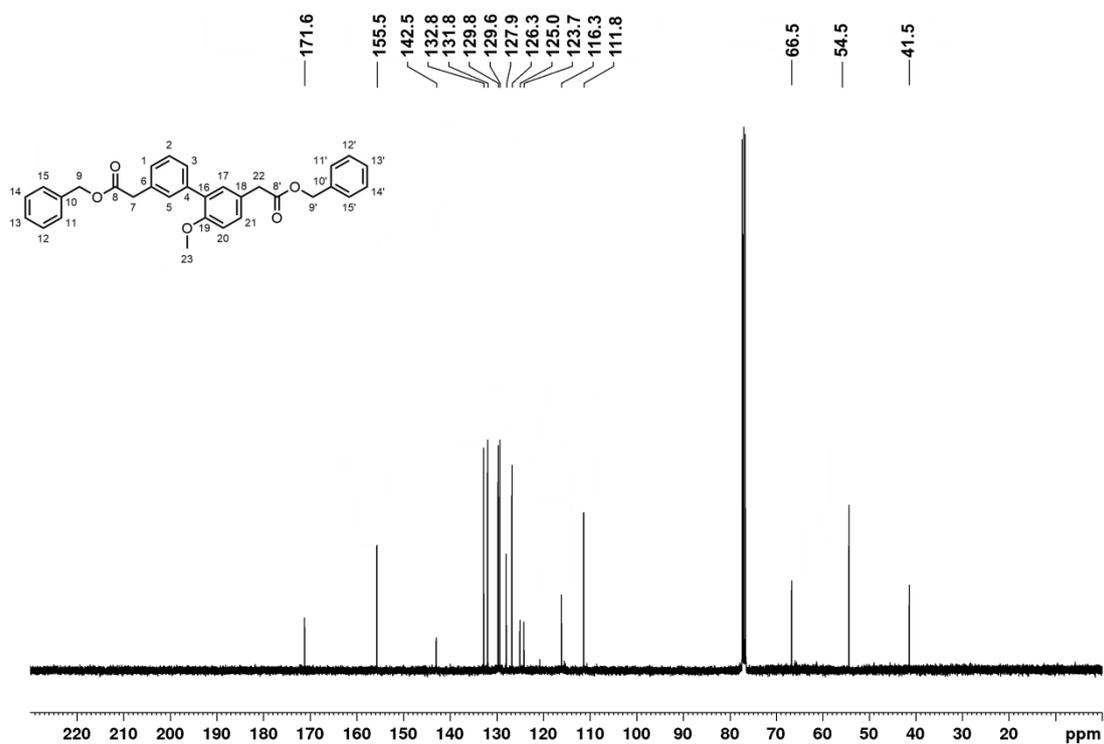
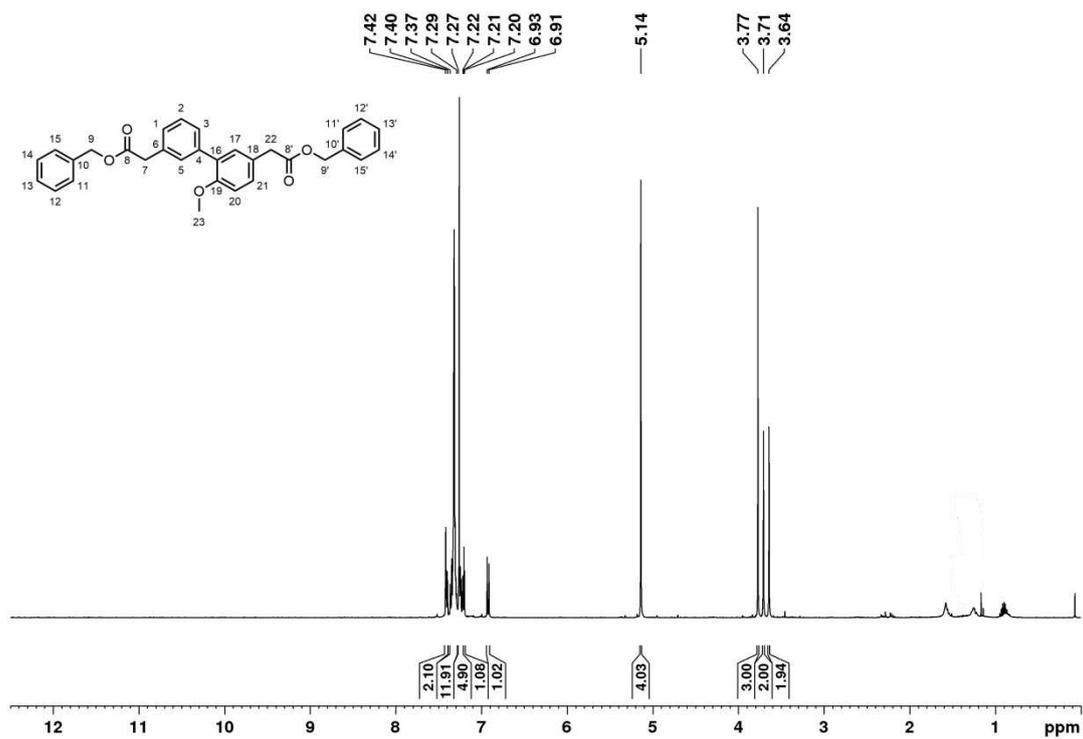
## Methyl-2-(3-chloro-4-((triisopropylsilyl)oxy)phenyl)acetat (21)



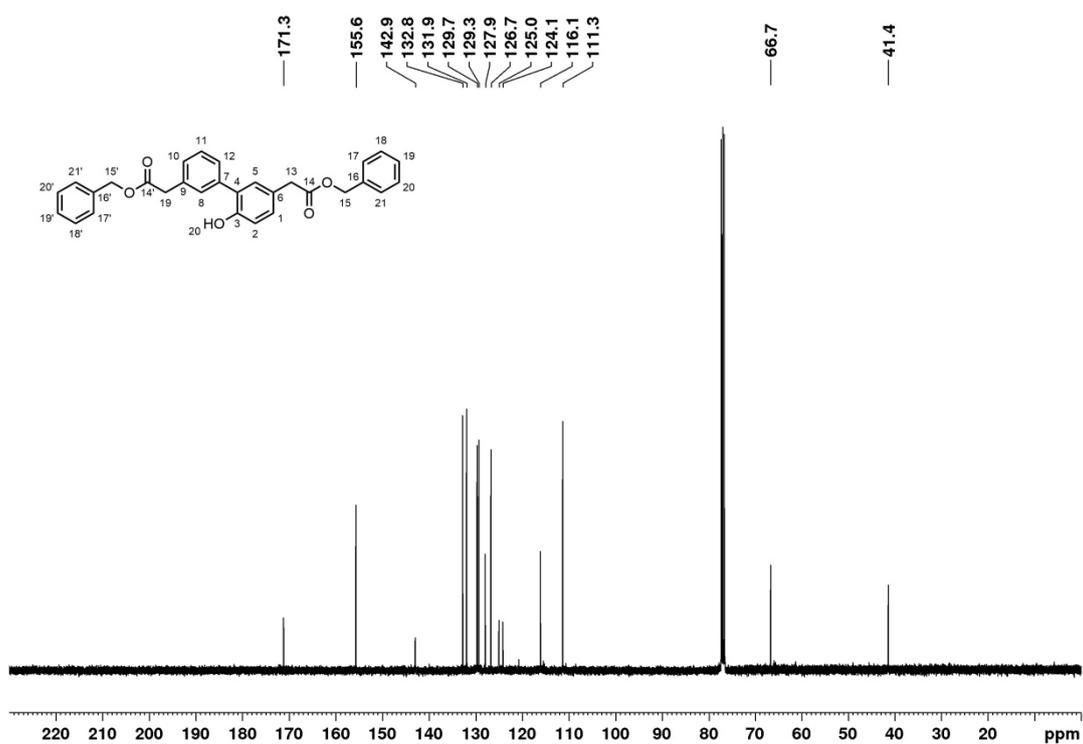
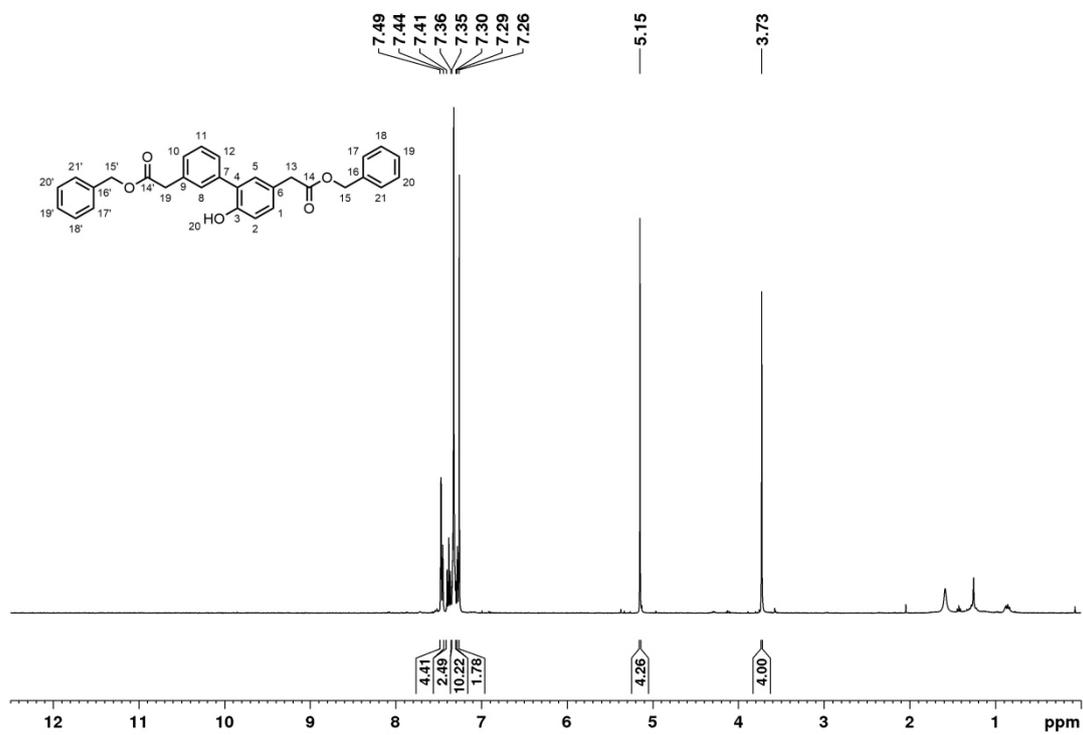
## Diethyl-2,2'-(6-methoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (18)



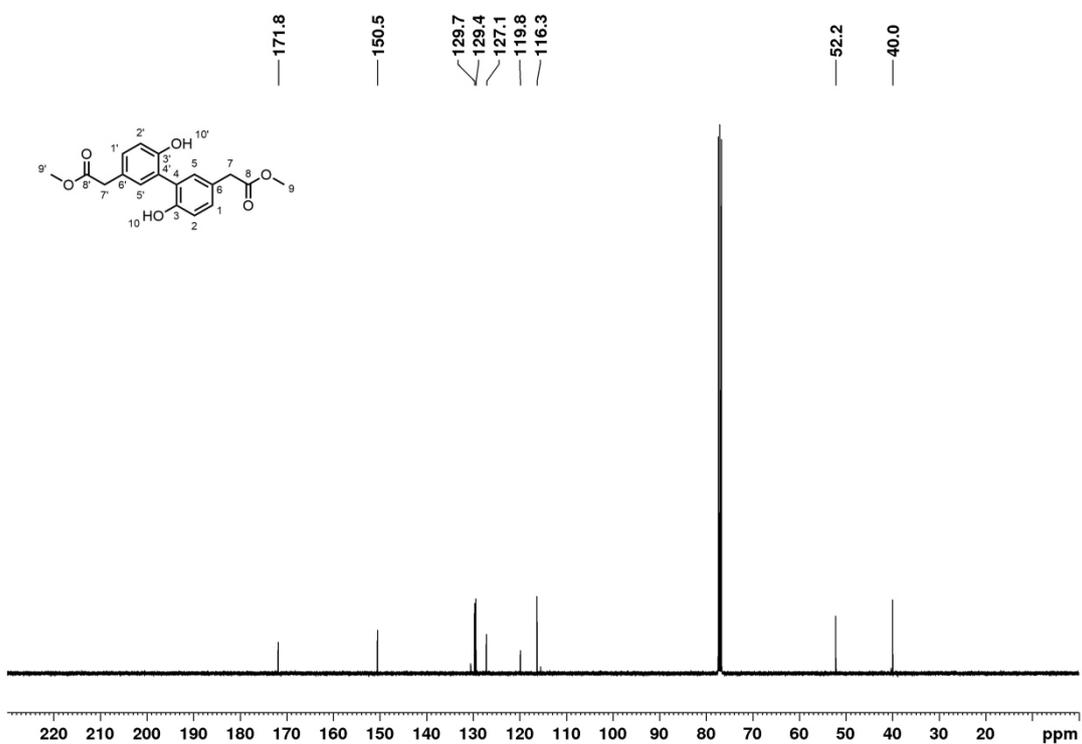
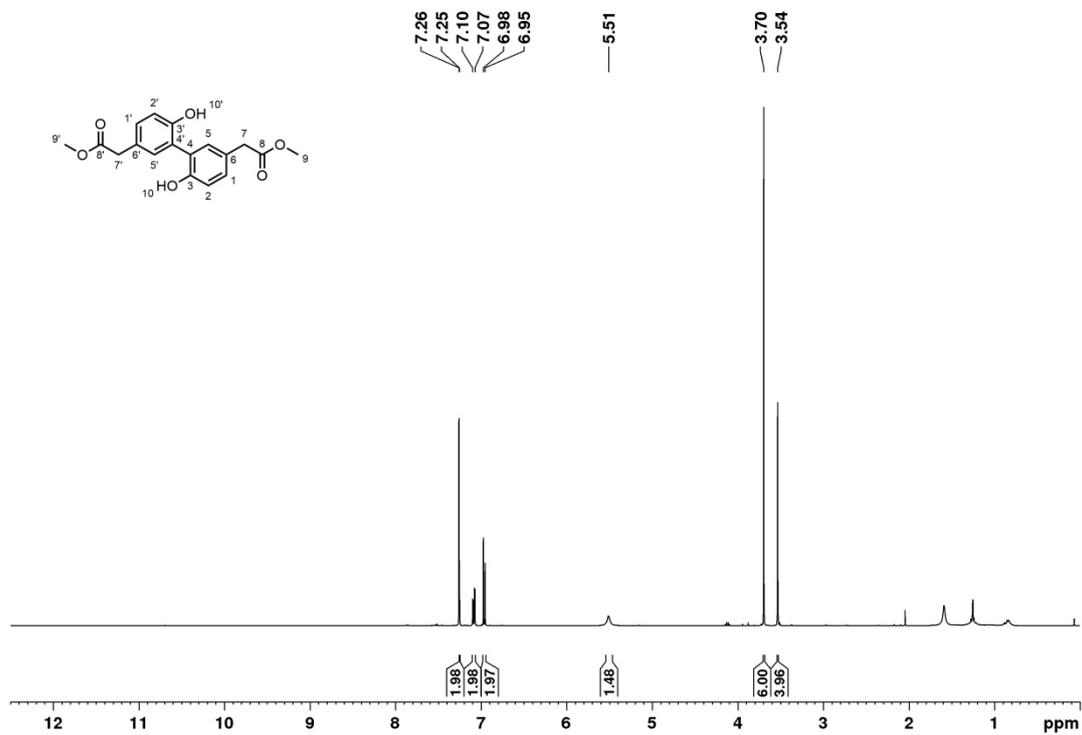
## Dibenzyl-2,2'-(6-methoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (19)



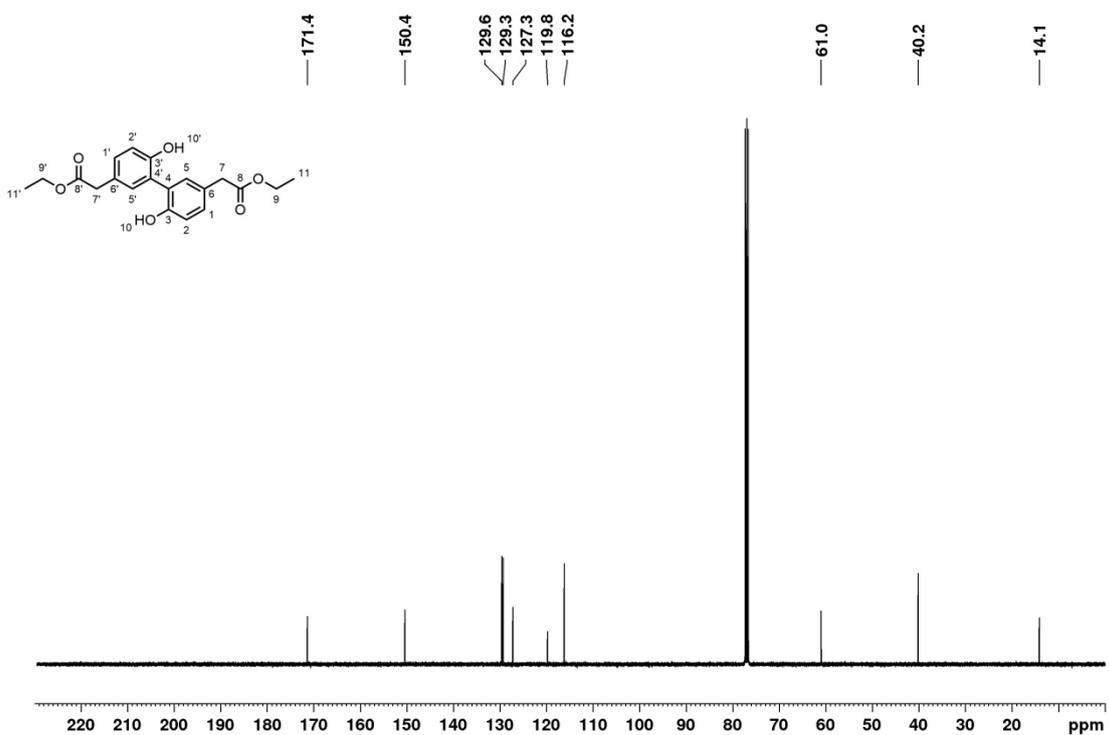
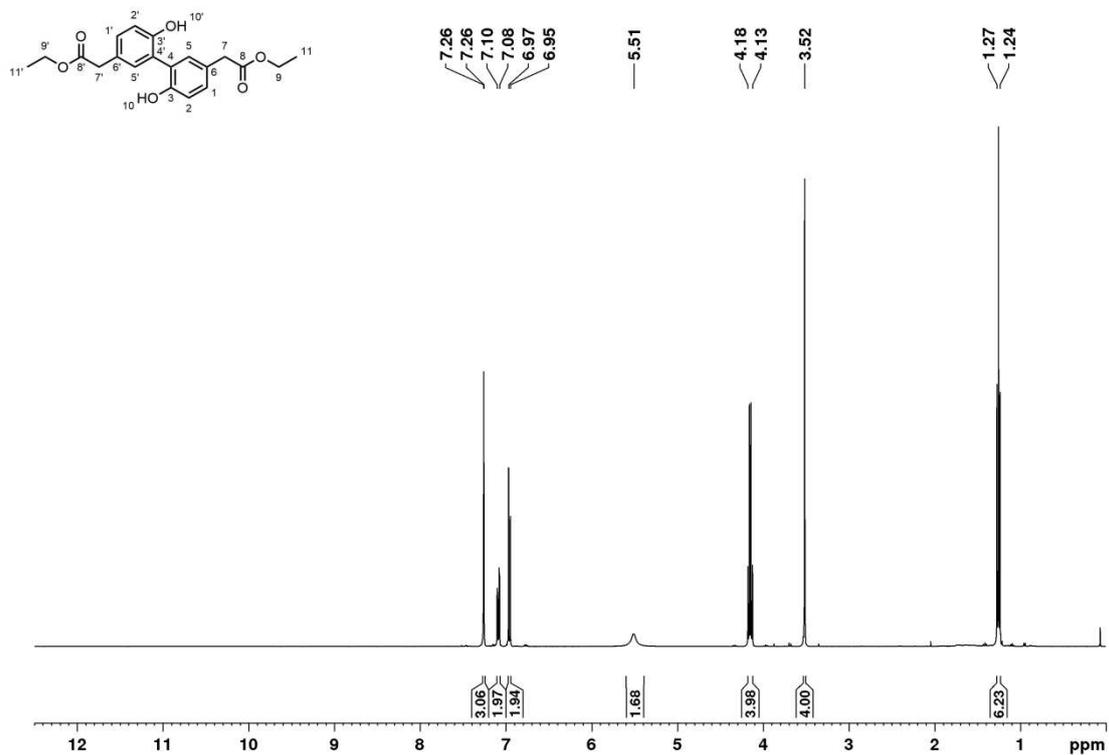
## Dibenzyl-2,2'-(6-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (23)



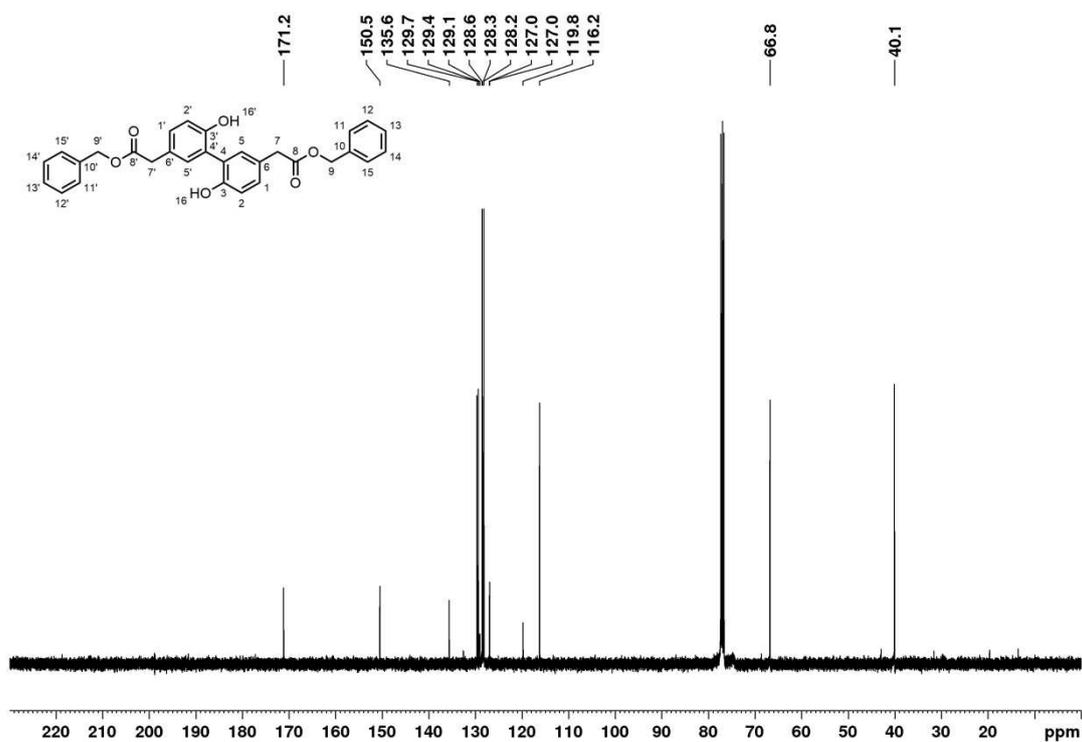
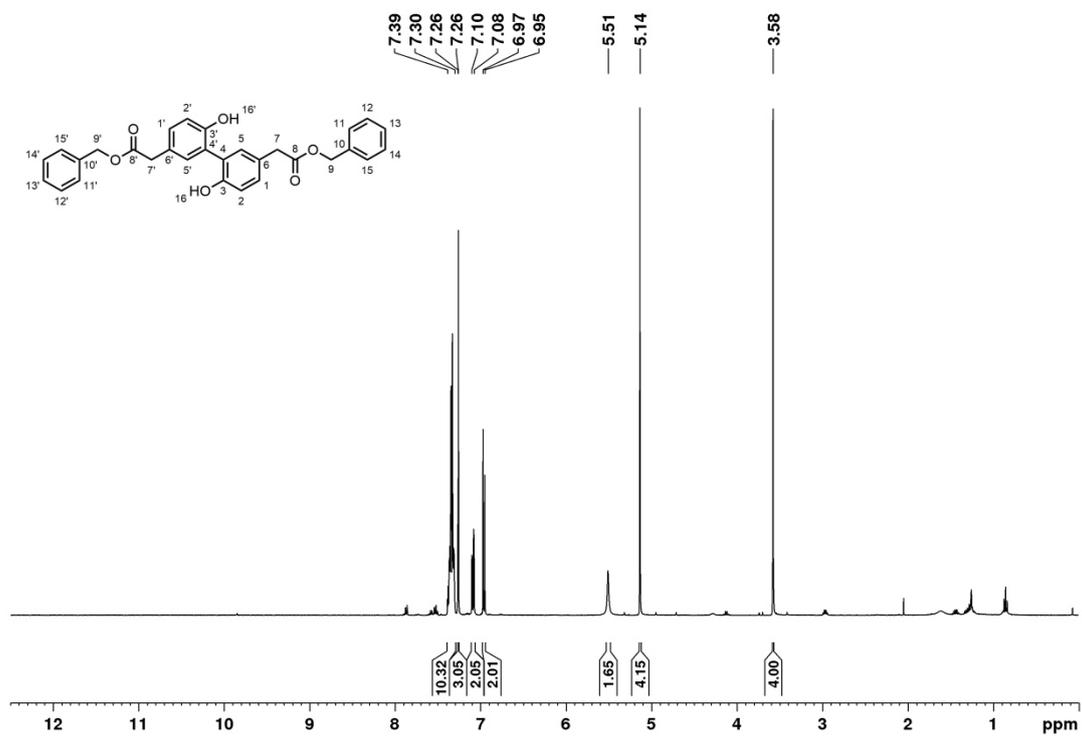
## Dimethyl-2,2'-(6,6'-dihydroxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (24)



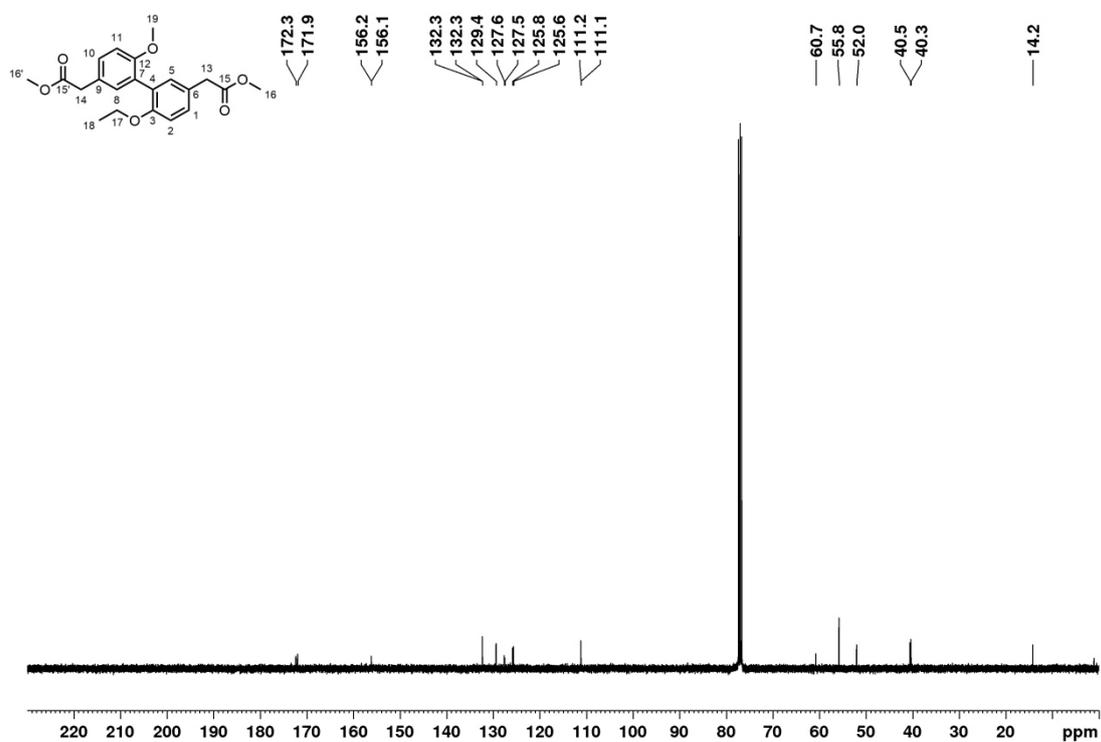
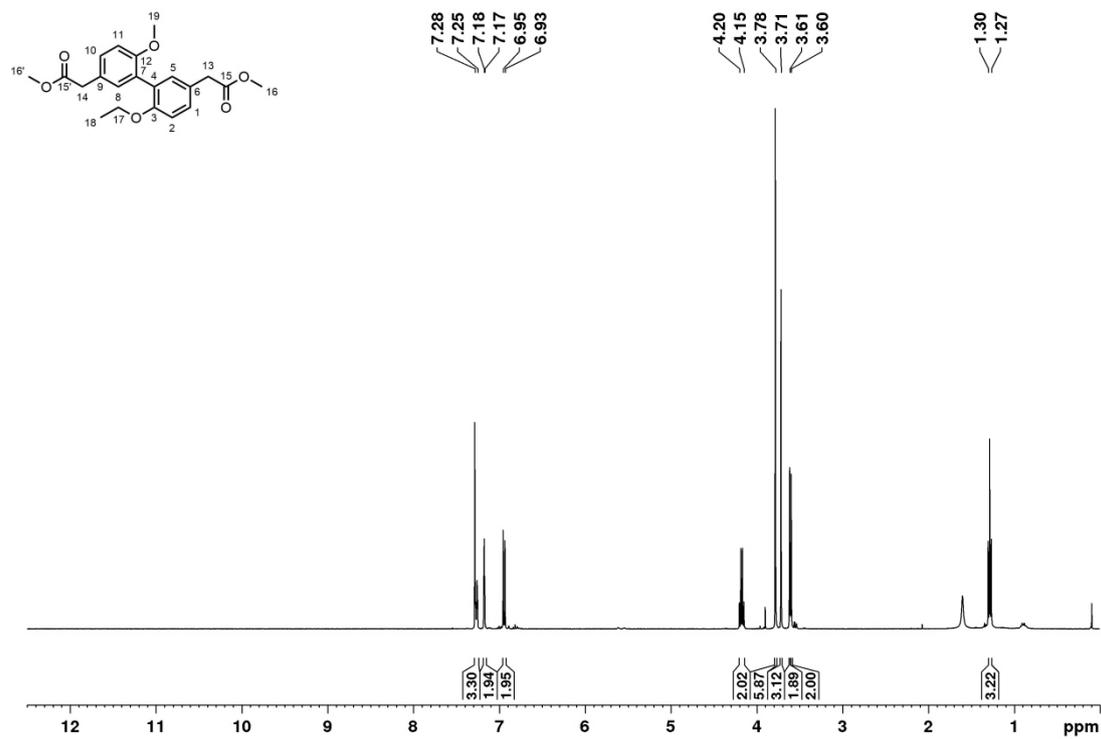
## Diethyl2,2'-(6,6'-dihydroxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (25)



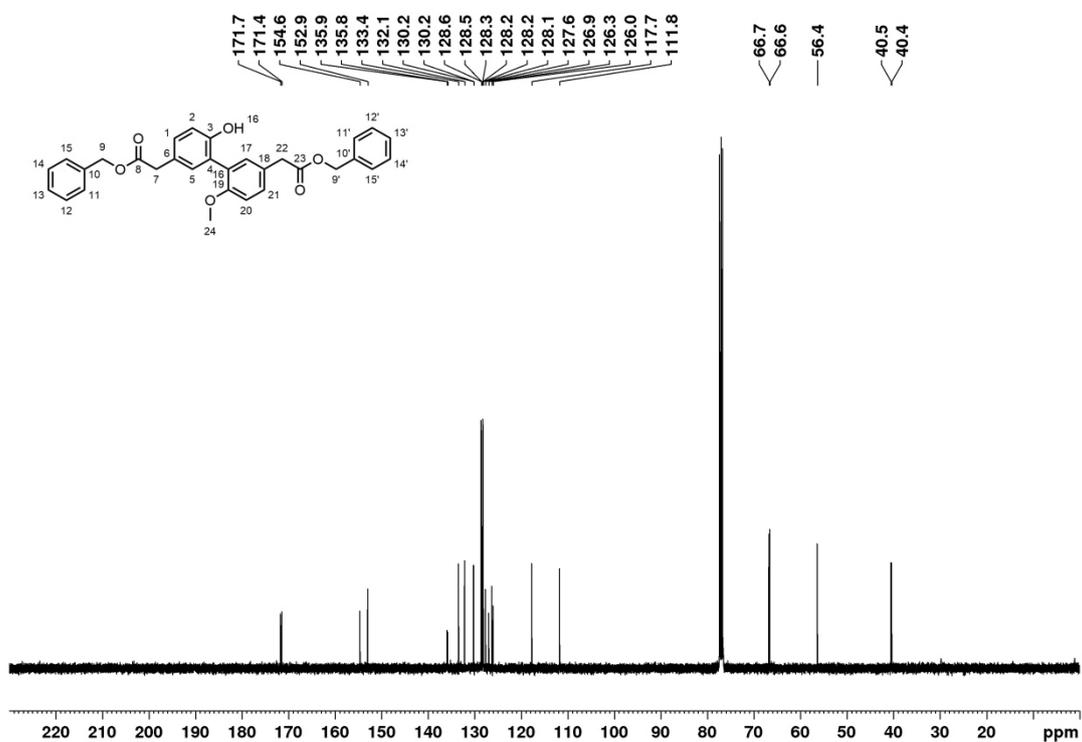
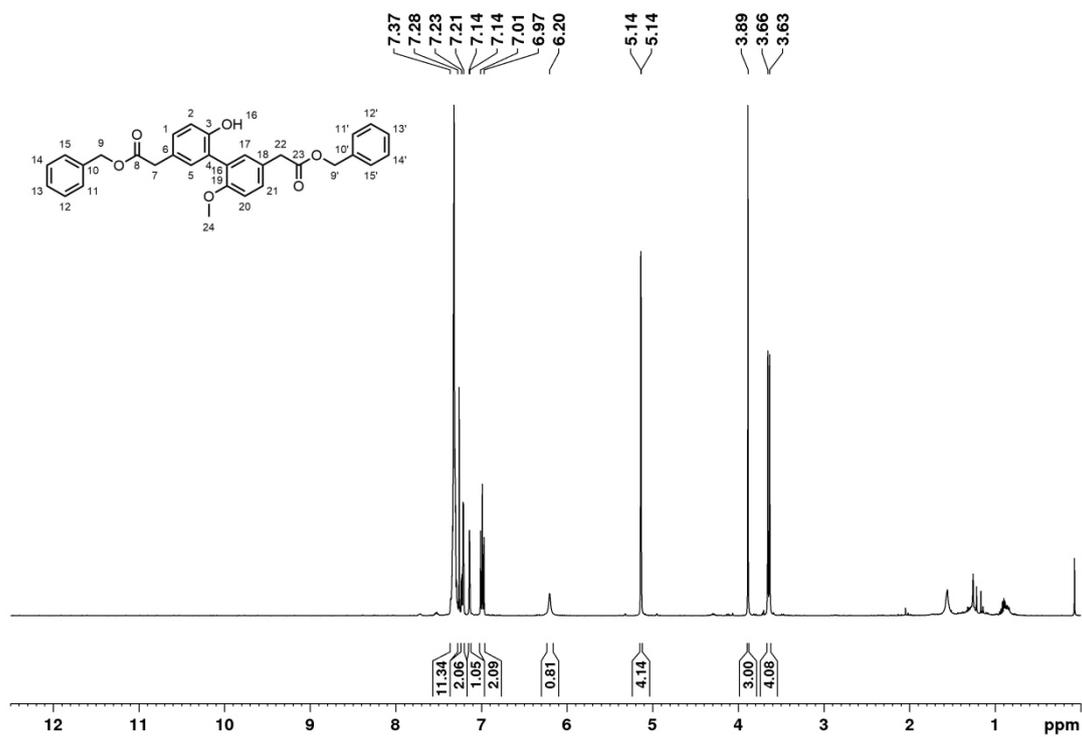
## Dibenzyl-2,2'-(6,6'-dihydroxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (26)



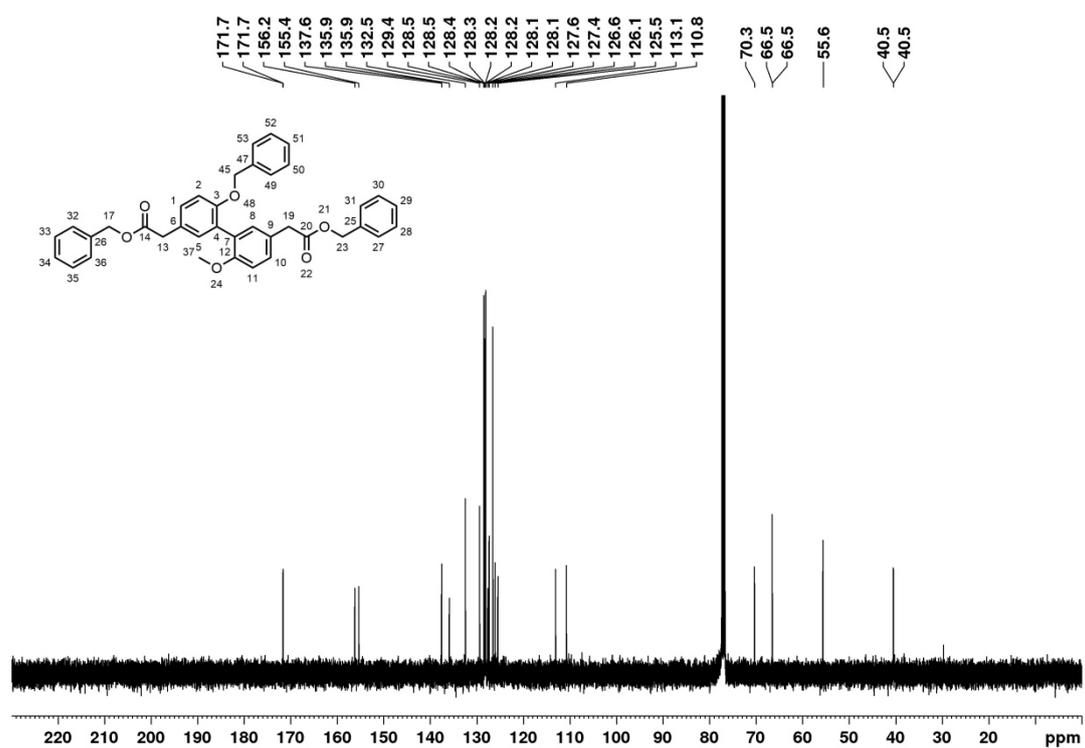
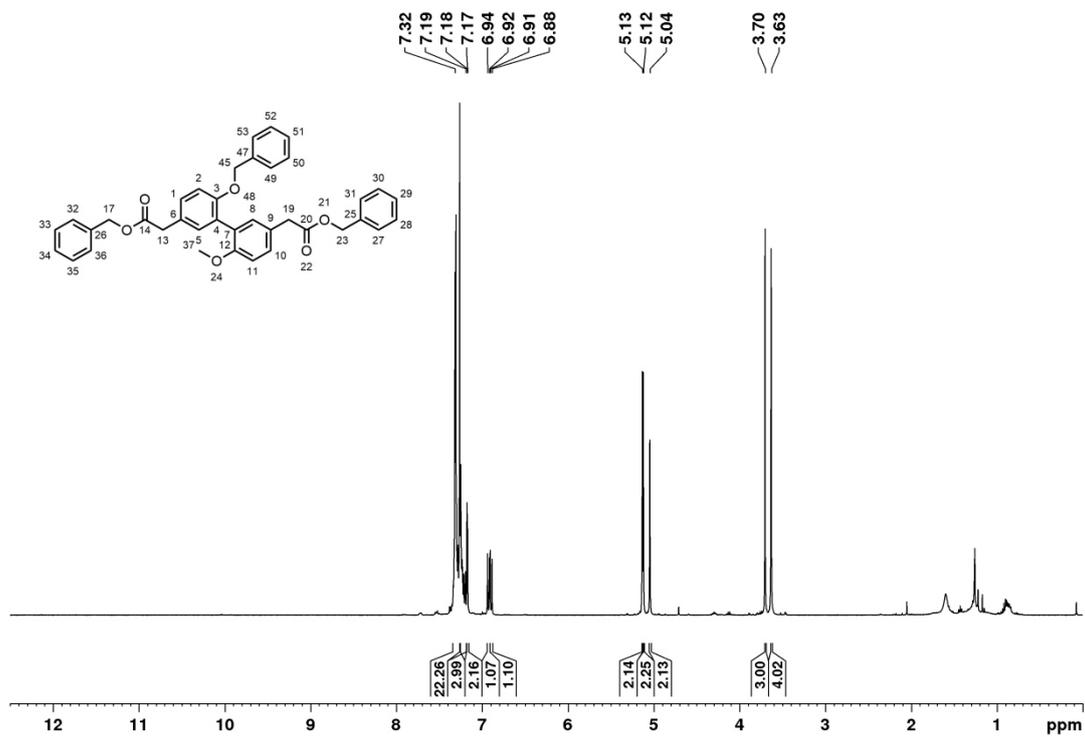
## Dimethyl-2,2'-(6-ethoxy-6'-methoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (28)



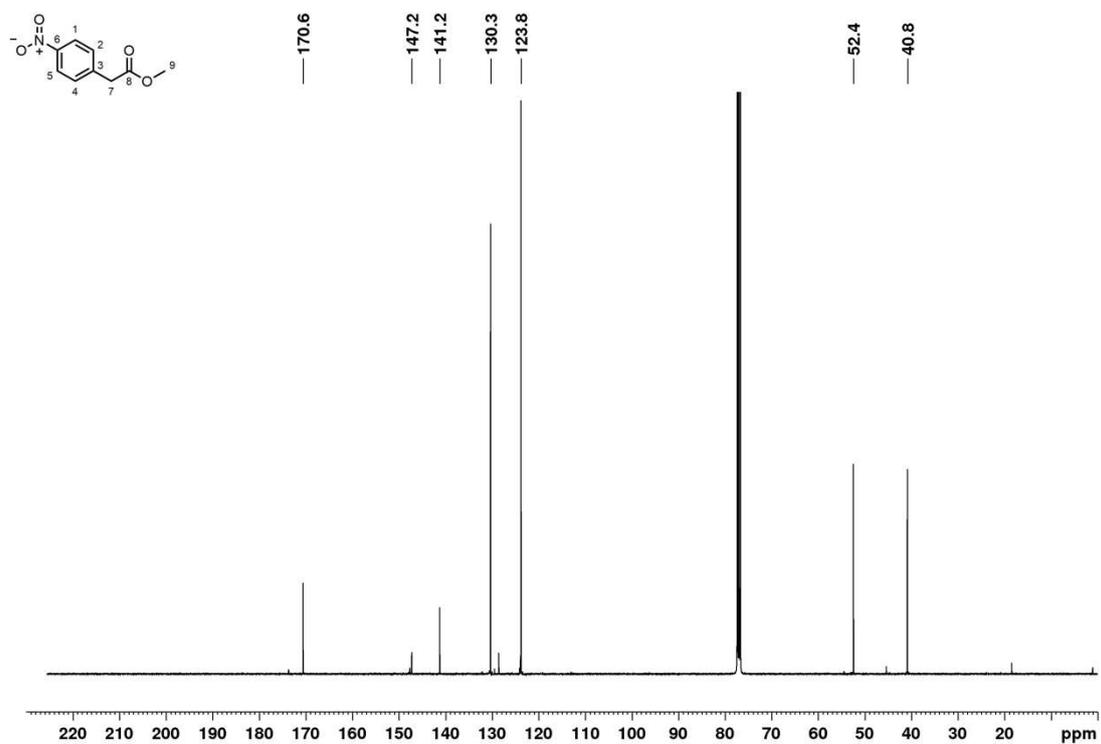
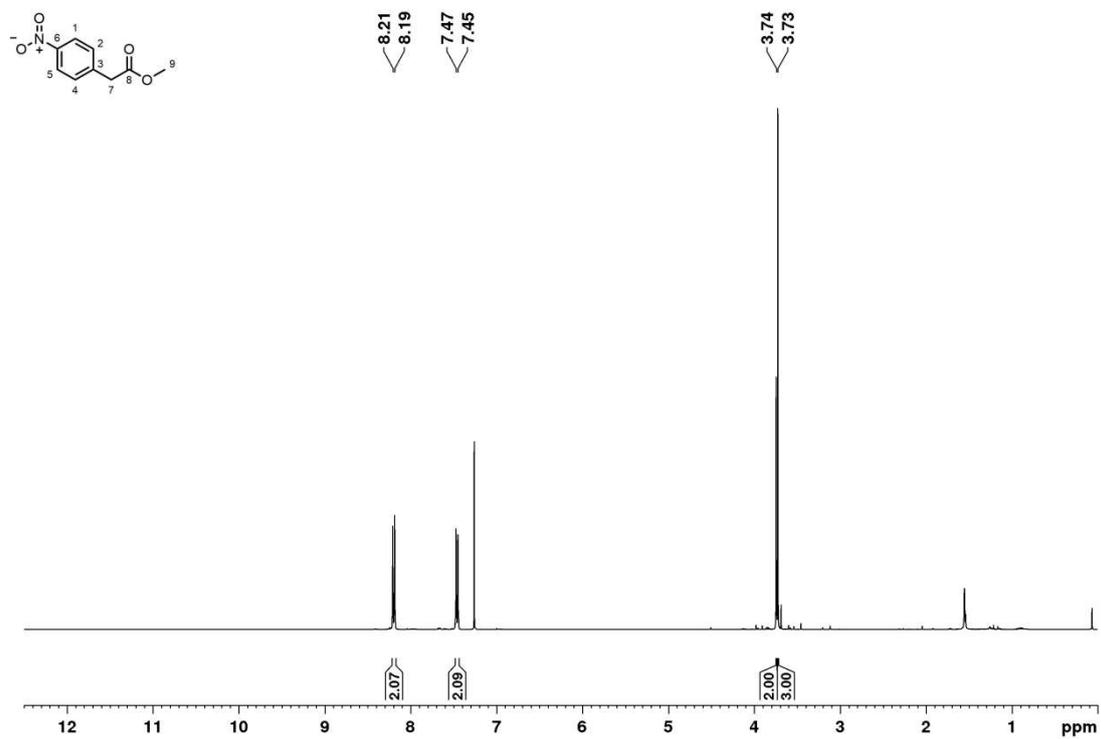
## Dibenzyl-2,2'-(6-hydroxy-6'-methoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl) diacetat (22)



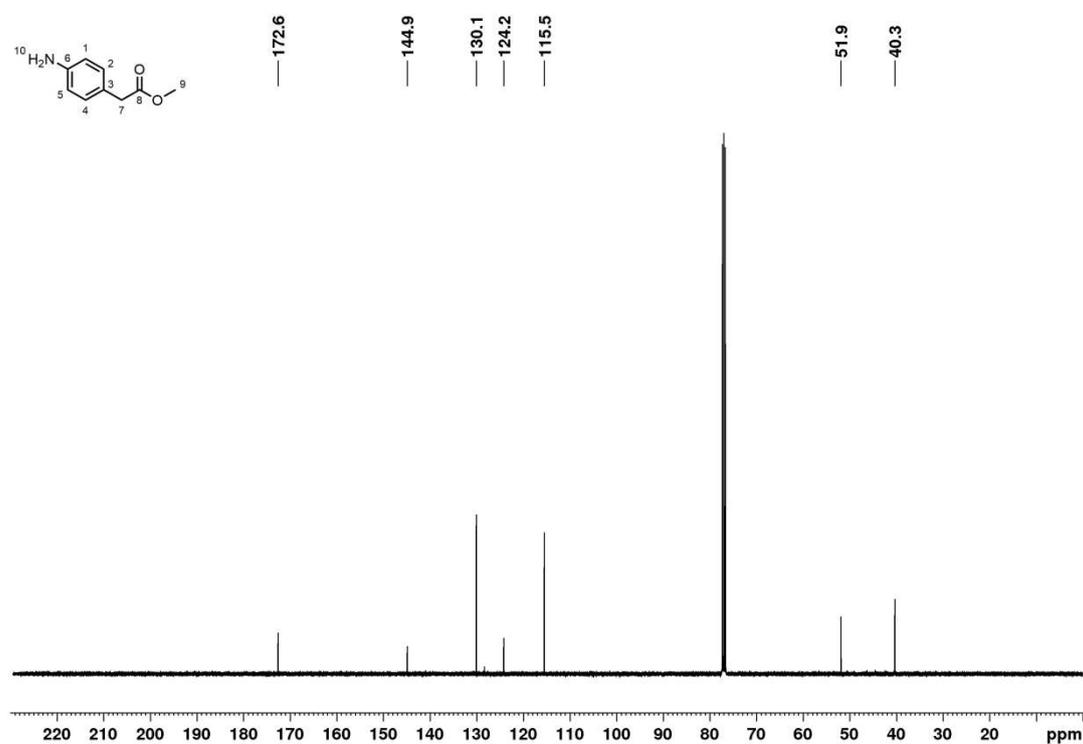
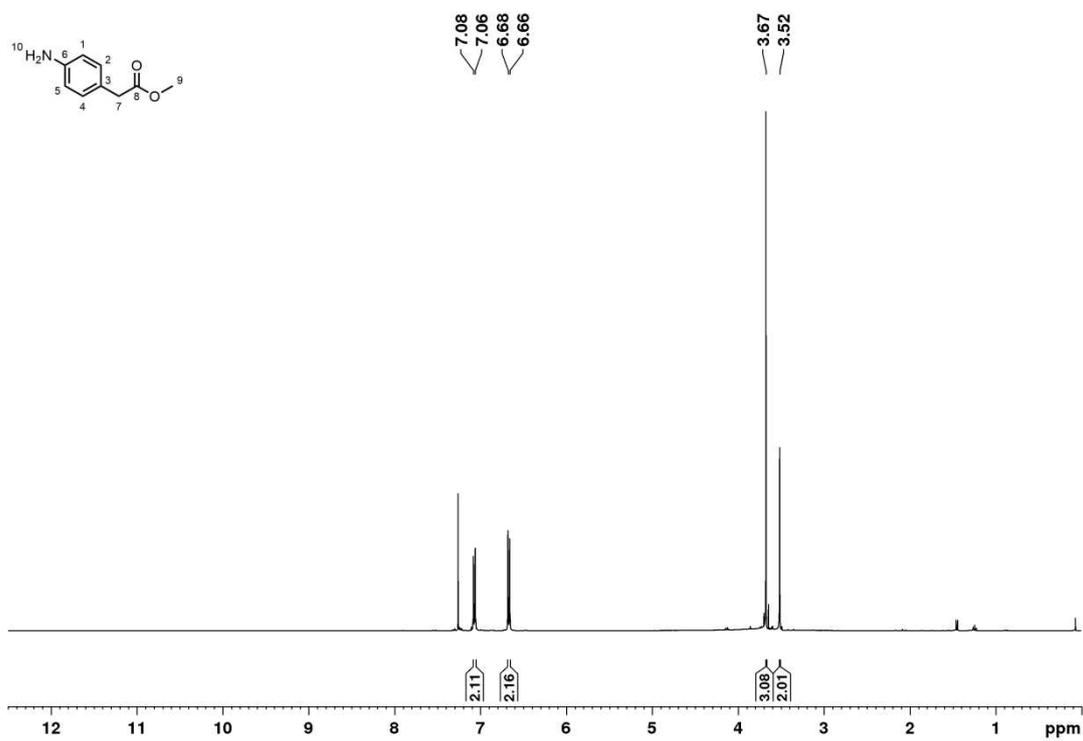
## Dibenzyl-2,2'-(6-(benzyloxy)-6'-methoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (27)



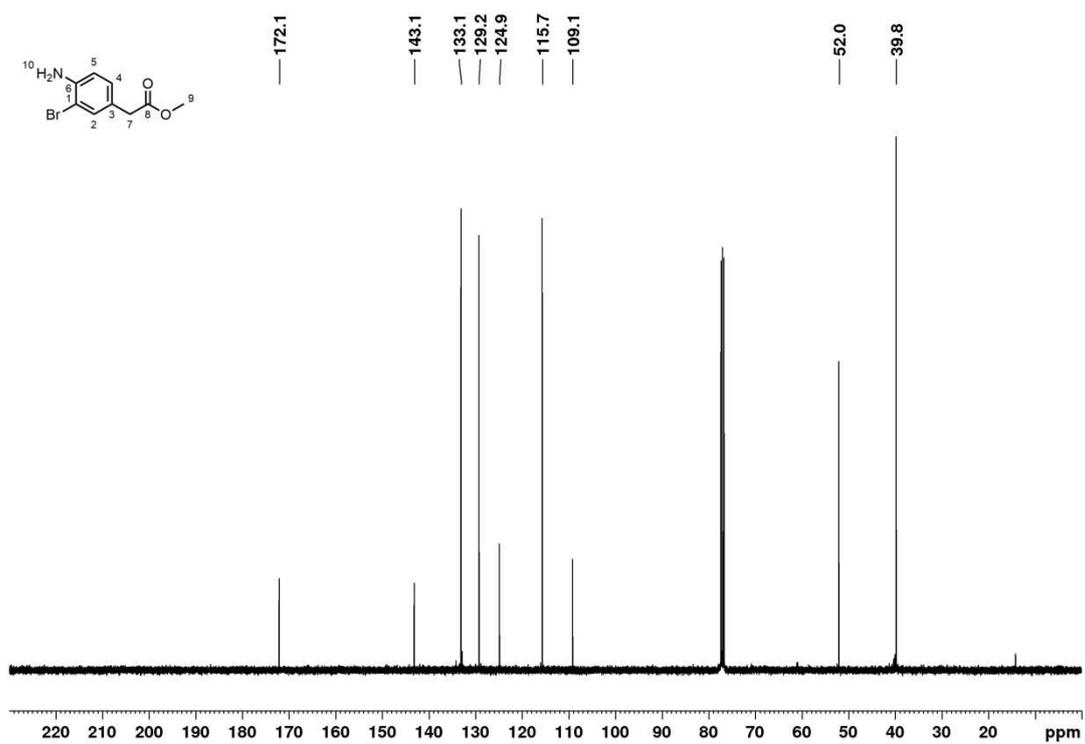
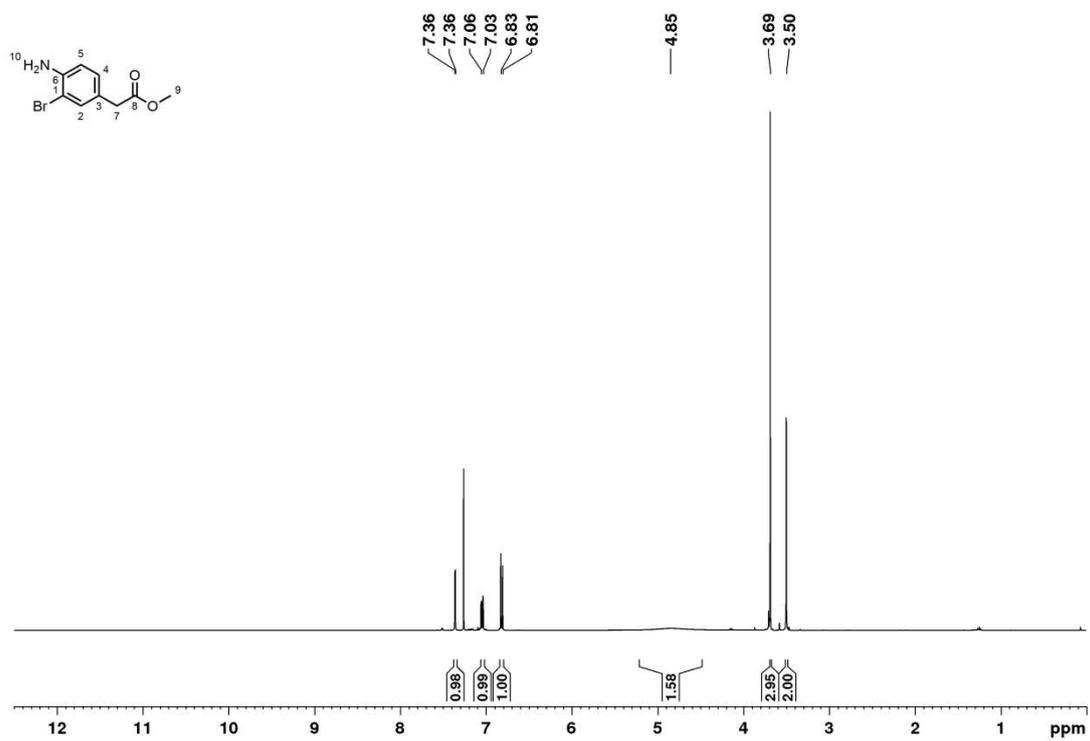
## Methyl-2-(4-nitrophenyl)acetat (29)



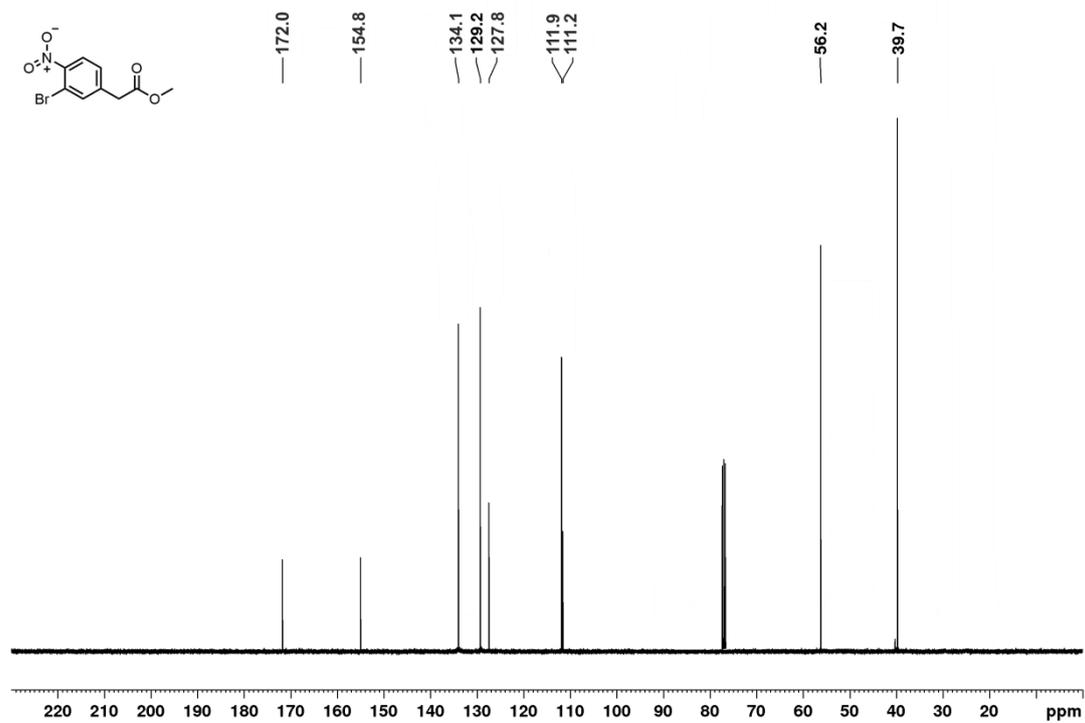
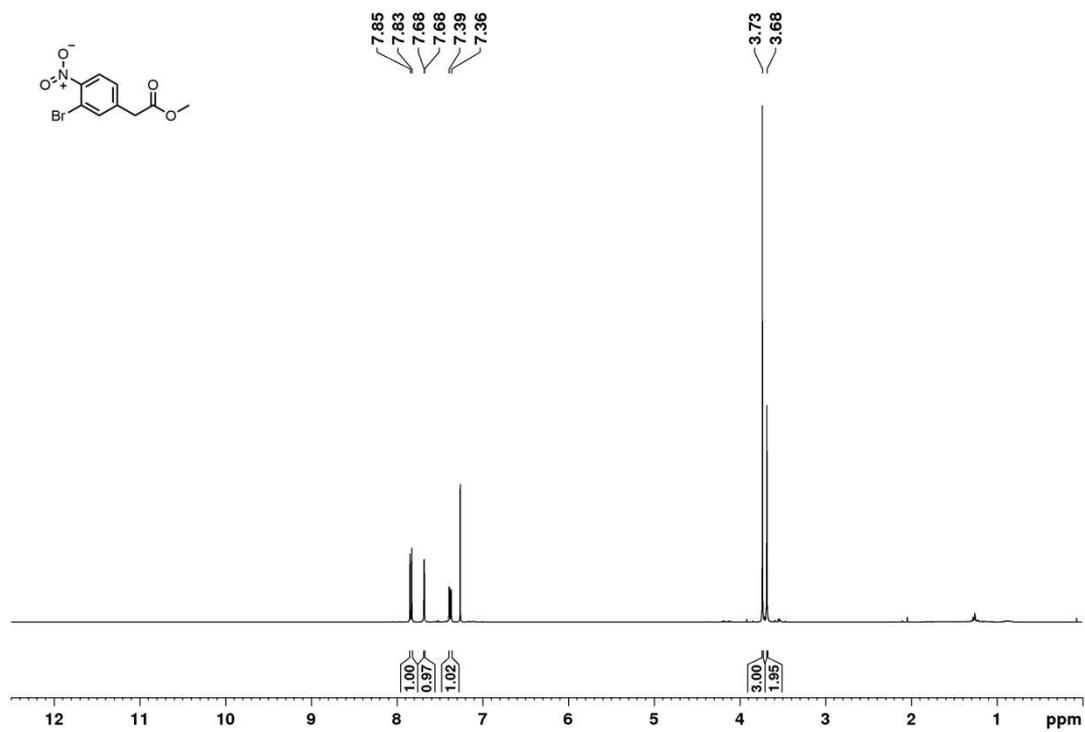
## Methyl-2-(4-aminophenyl)acetat (31)



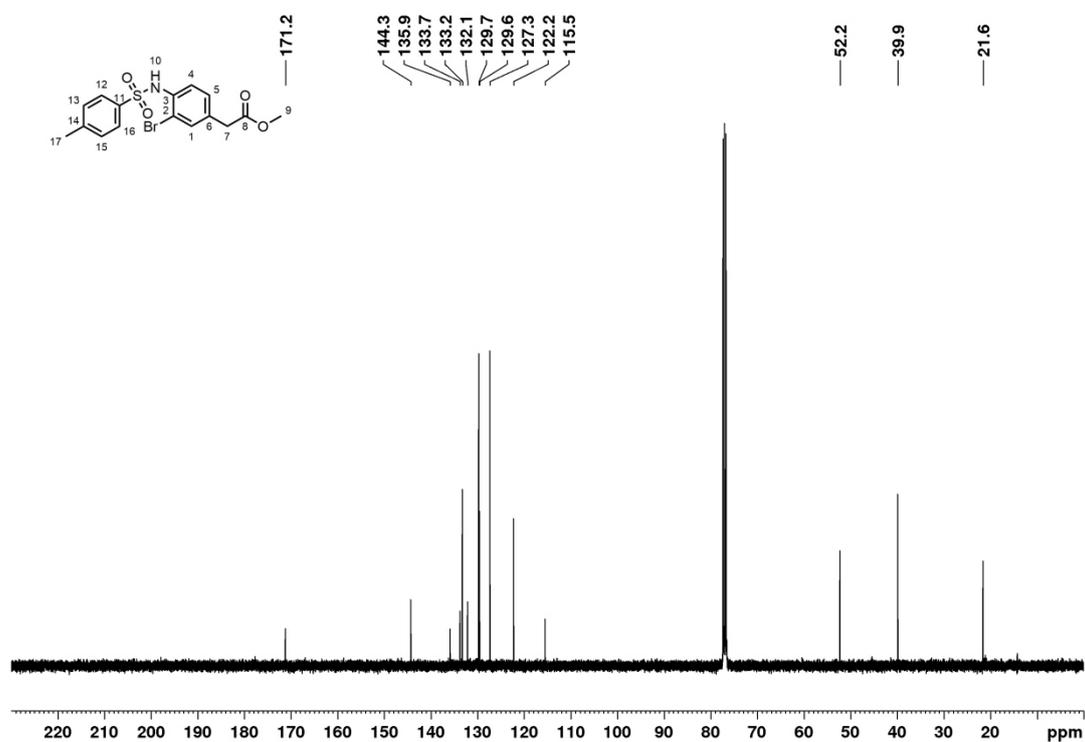
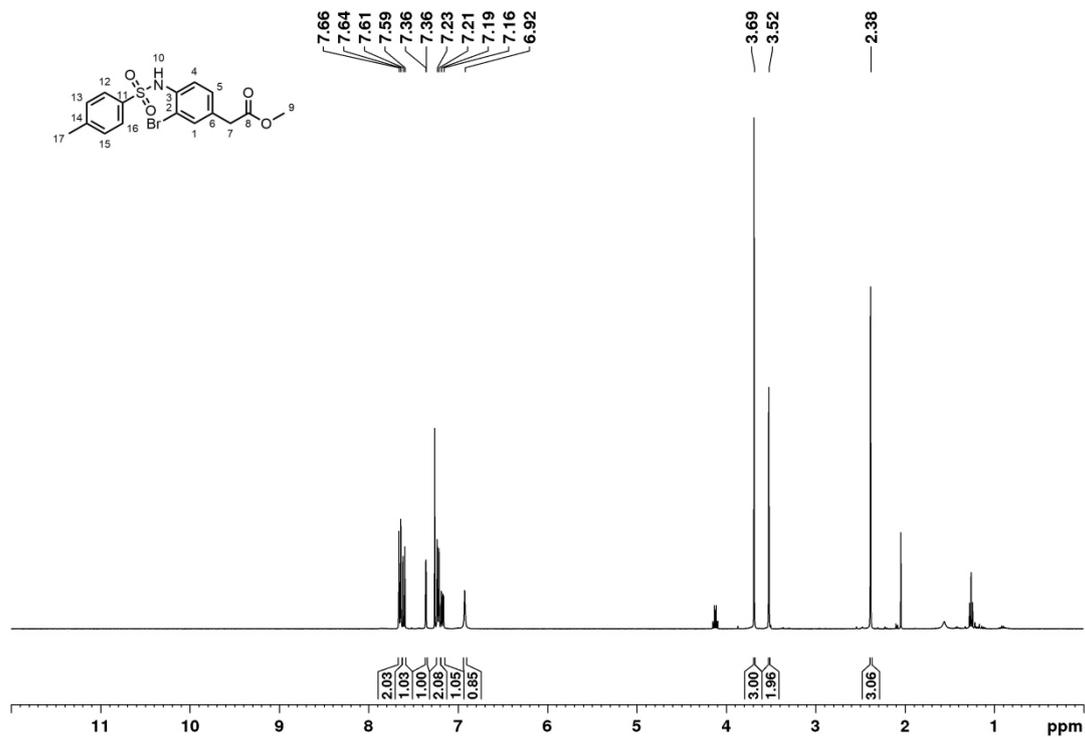
## Methyl-2-(4-amino-3-bromophenyl)acetat (32)



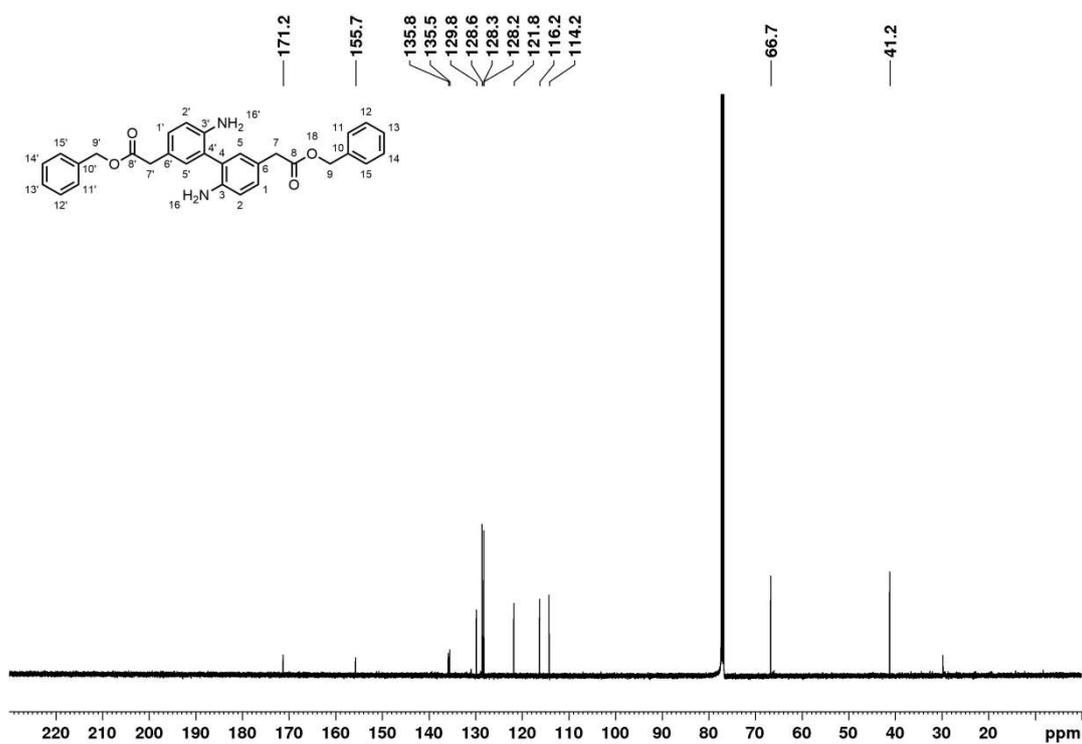
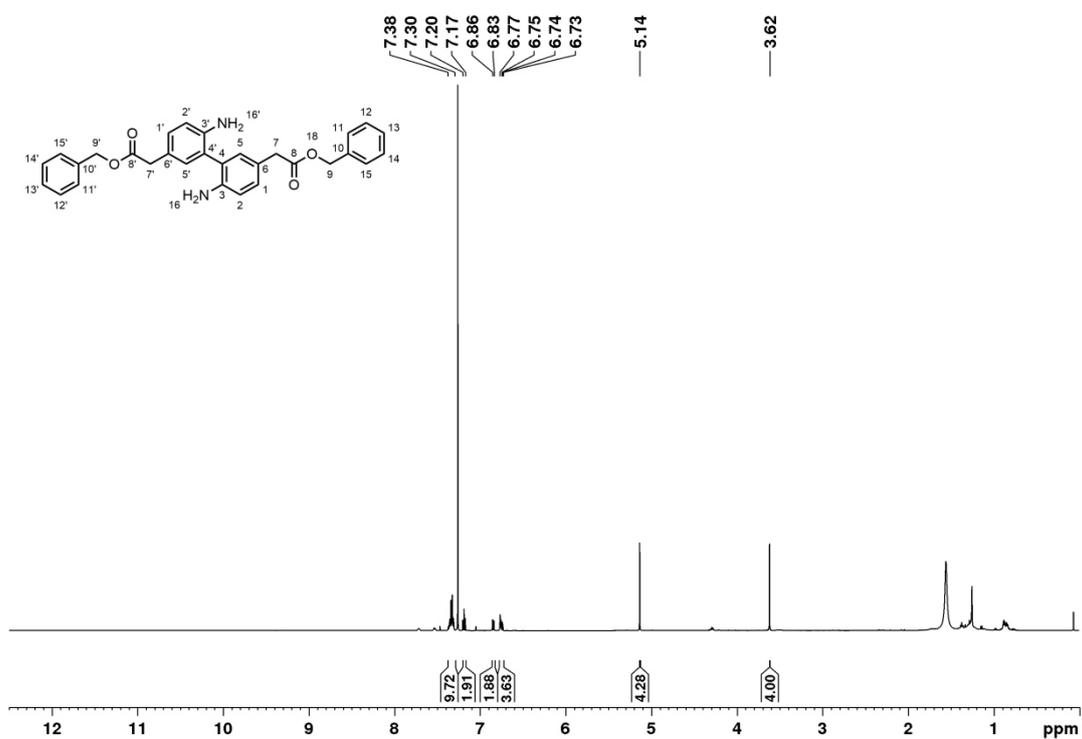
## Methyl-2-(3-bromo-4-nitrophenyl)acetat (33)



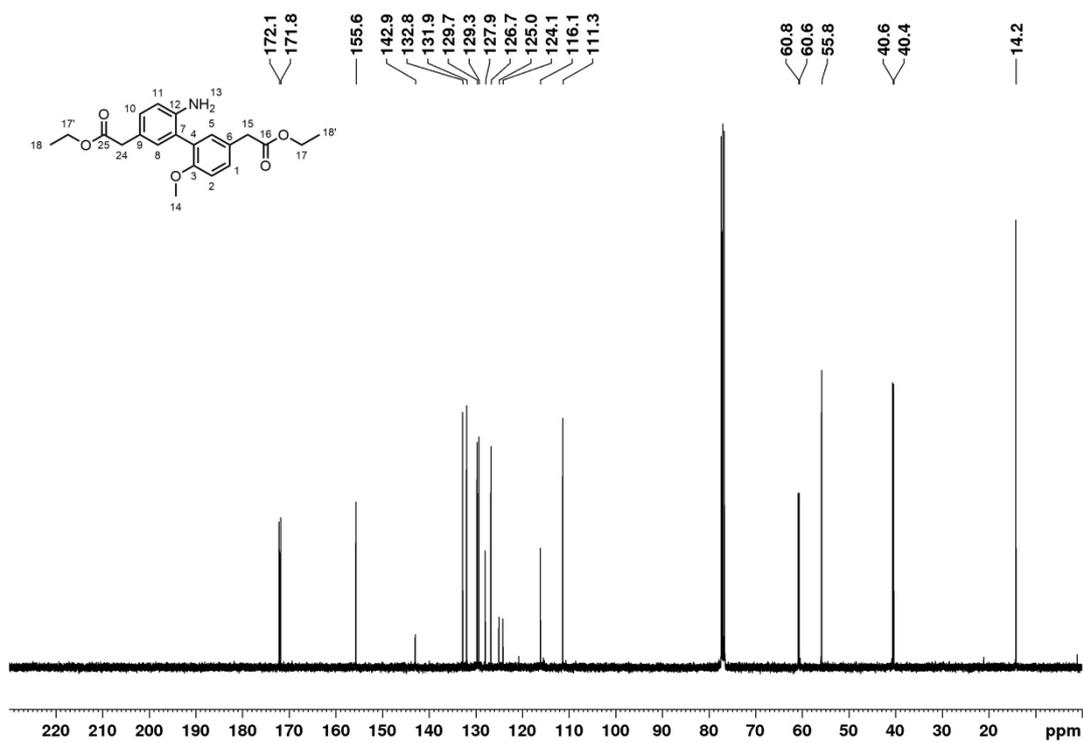
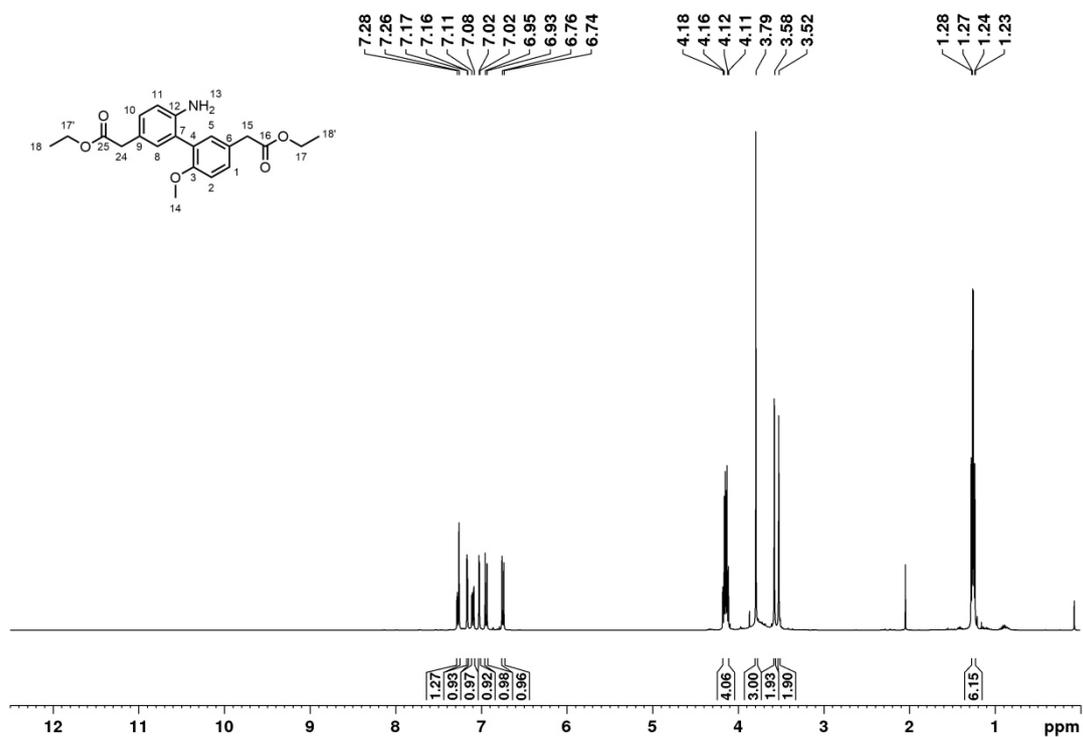
## Methyl-2-(3-bromo-4-((4-methylphenyl)sulfonamido)phenyl)acetat (42)



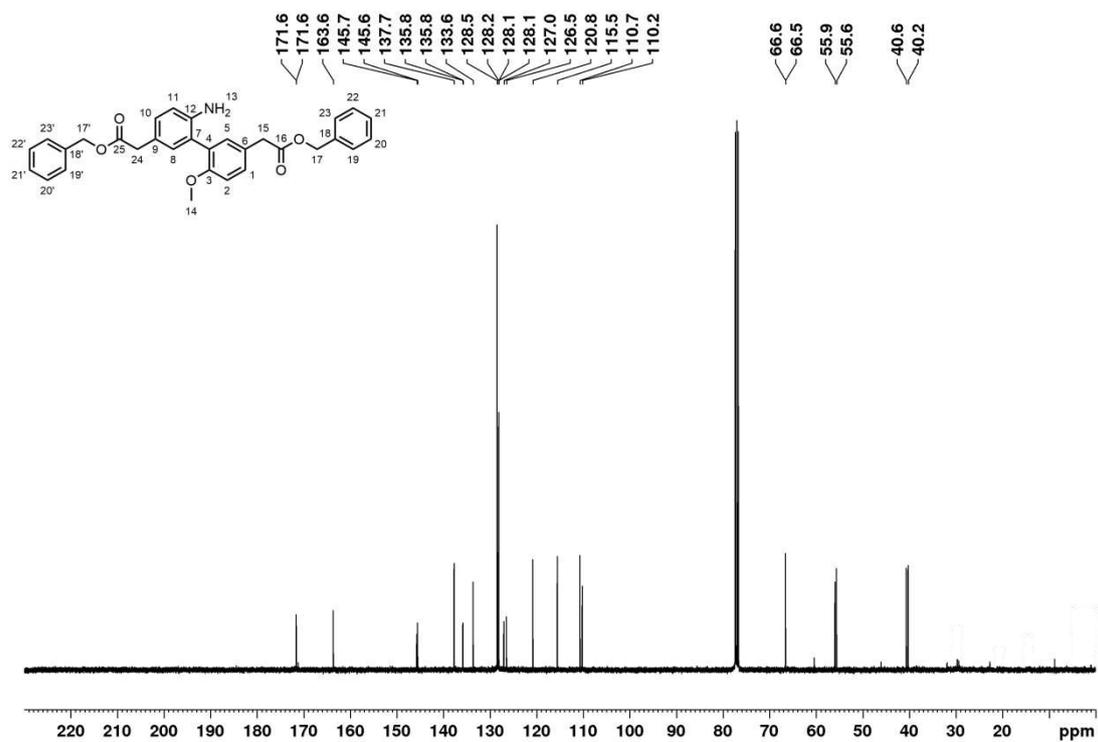
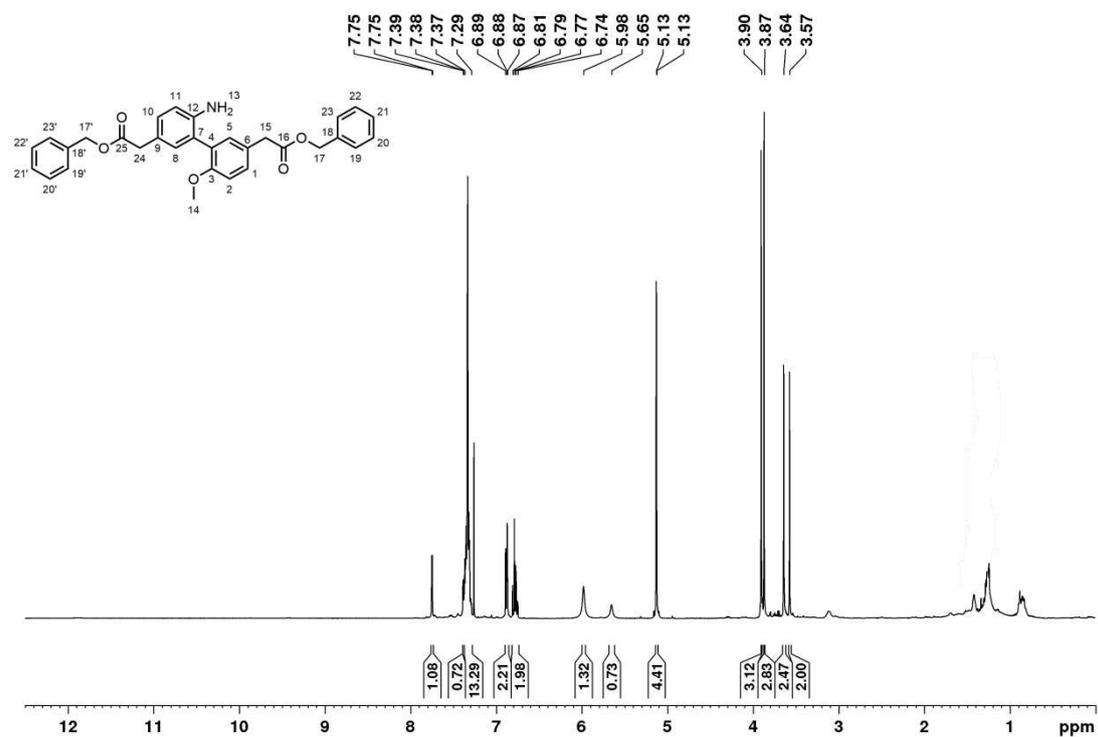
## Dibenzyl-2,2'-(6,6'-diamino-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (34)



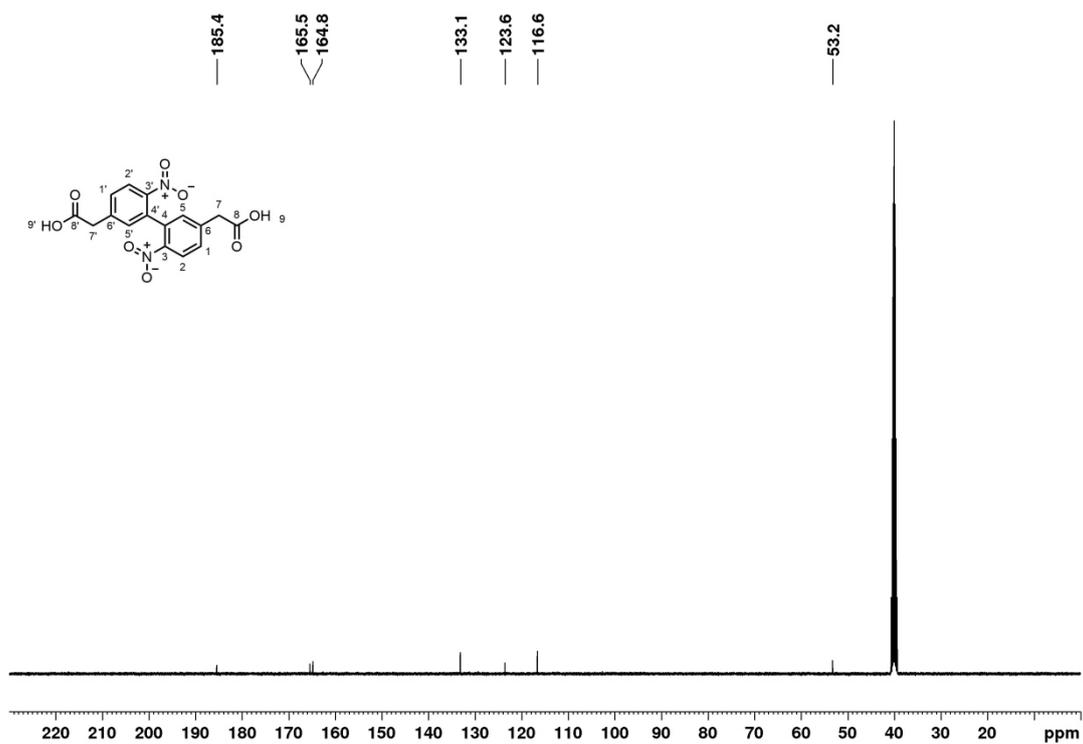
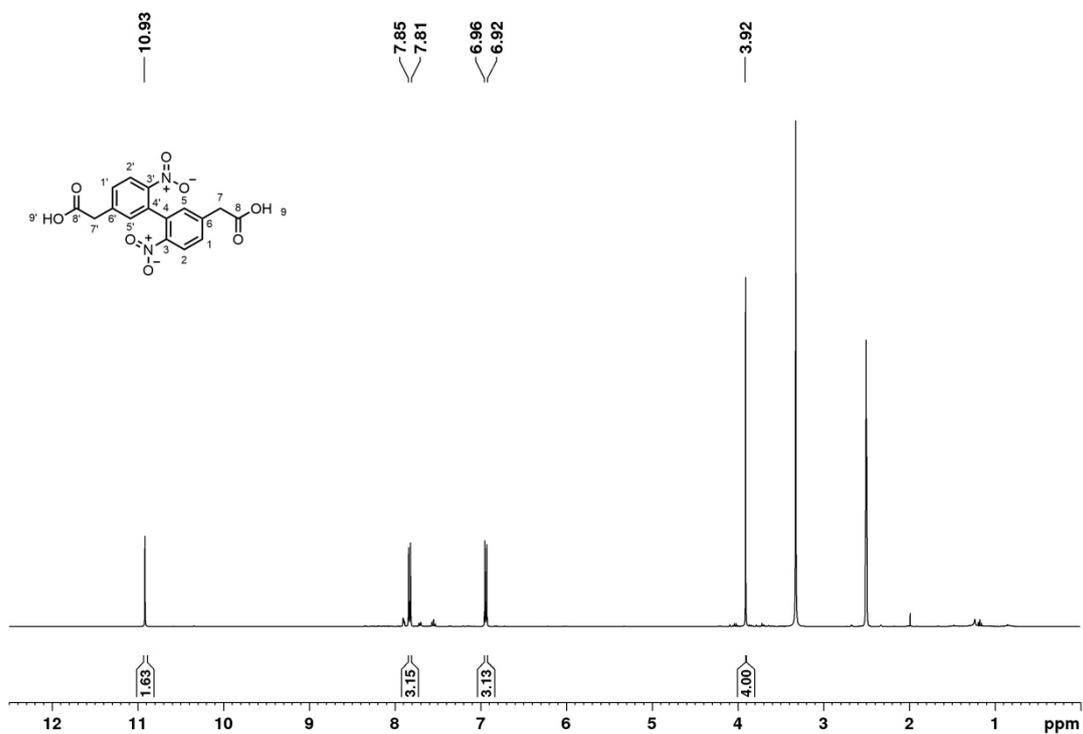
## Diethyl-2,2'-(6-amino-6'-methoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (40)



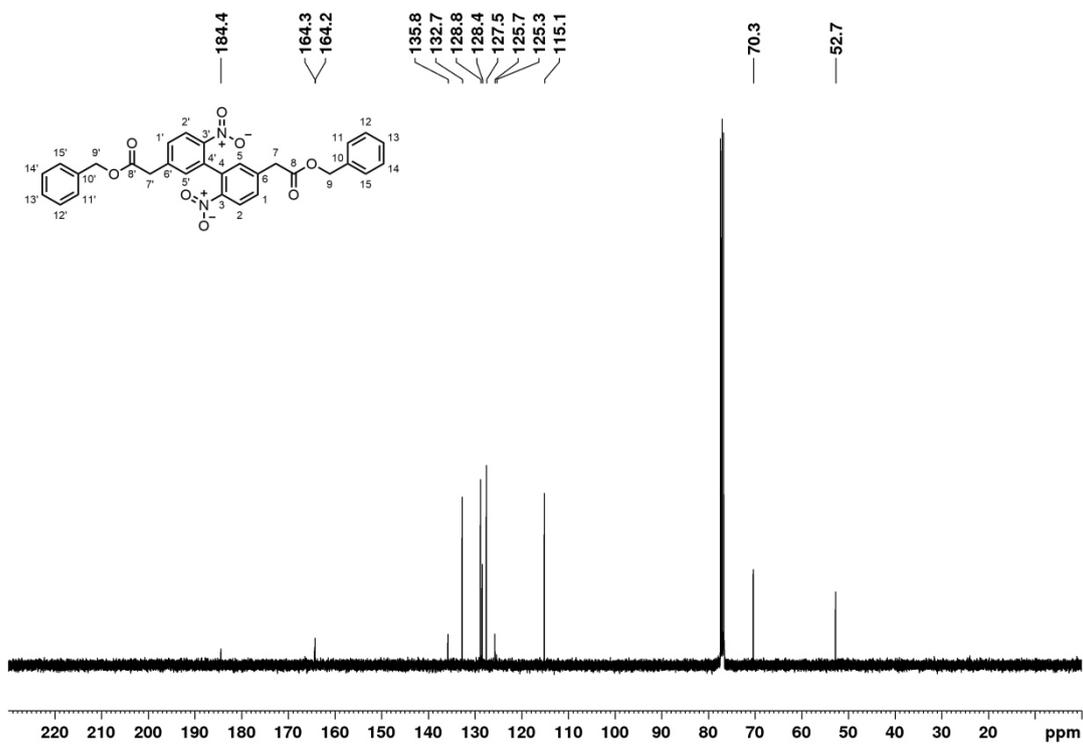
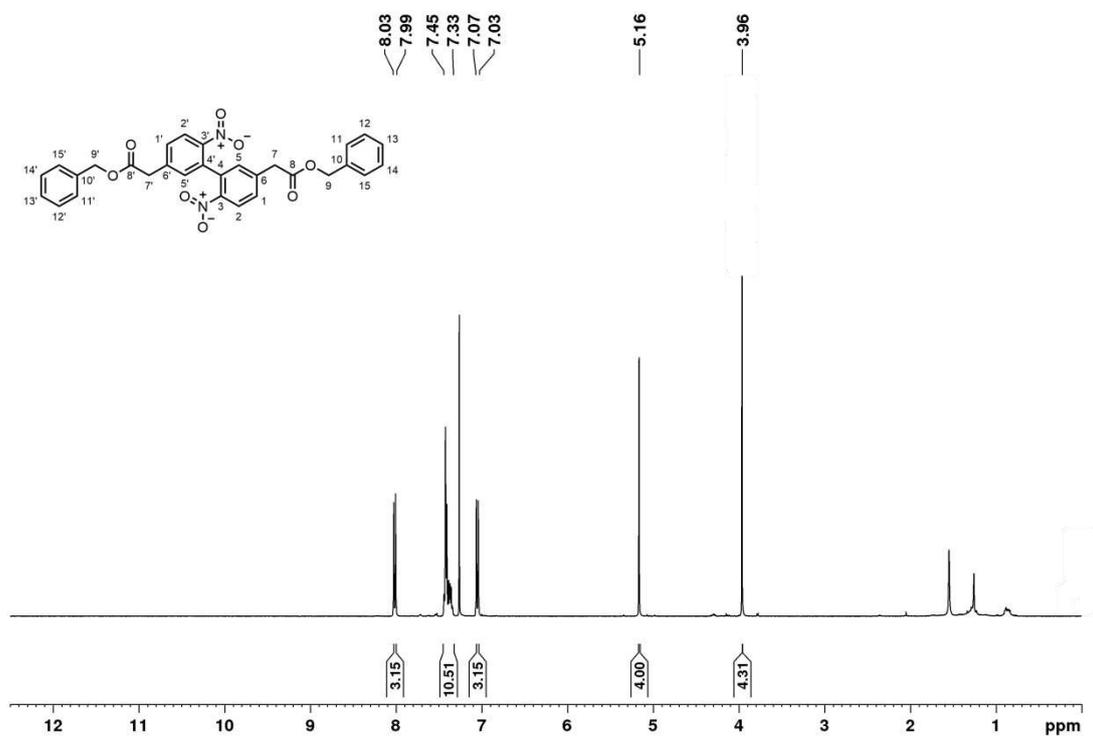
## Dibenzyl-2,2'-(6-amino-6'-methoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (41)



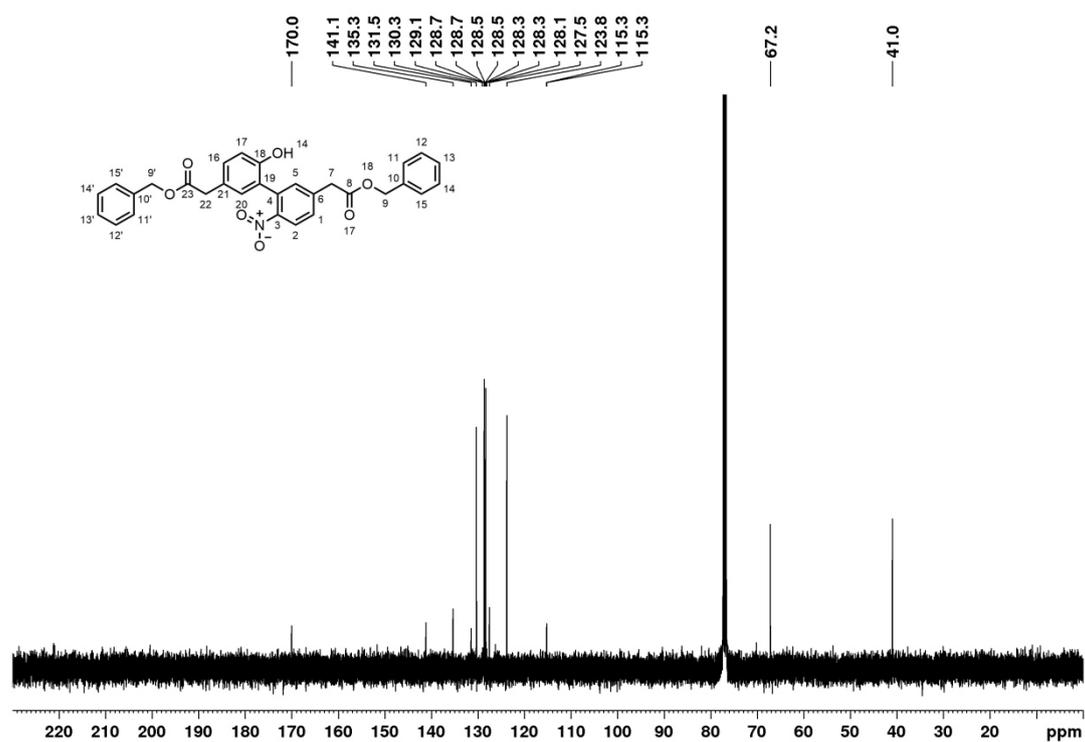
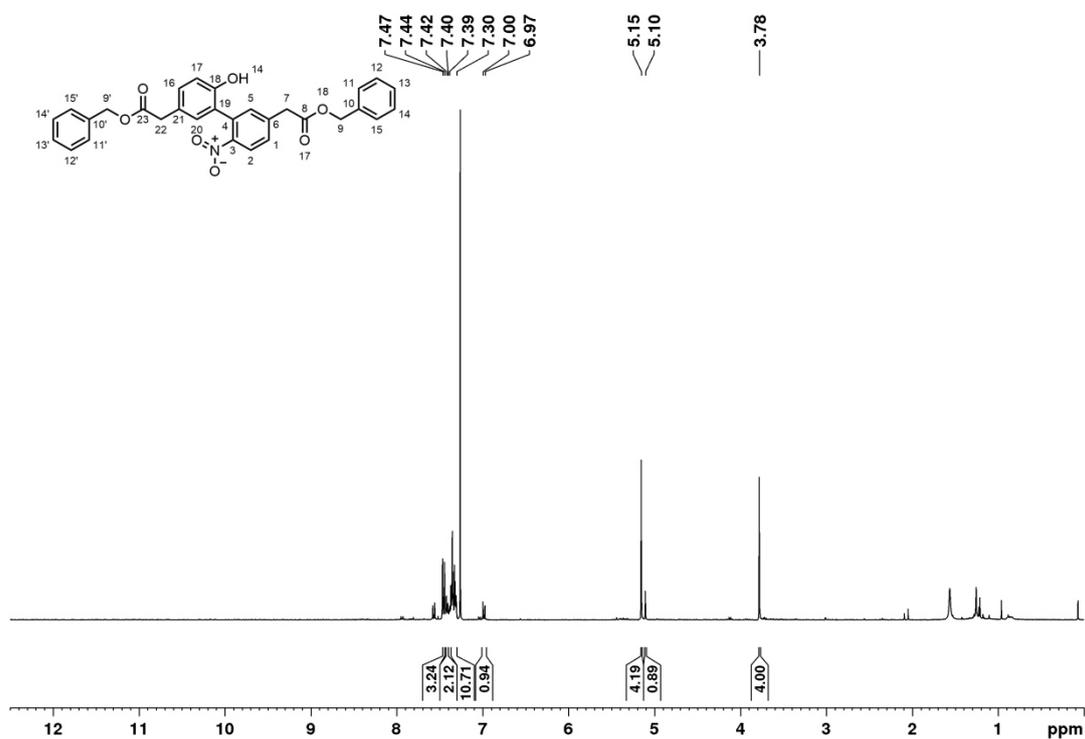
## 2,2'-(6,6'-dinitro-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diessigsäure (37)



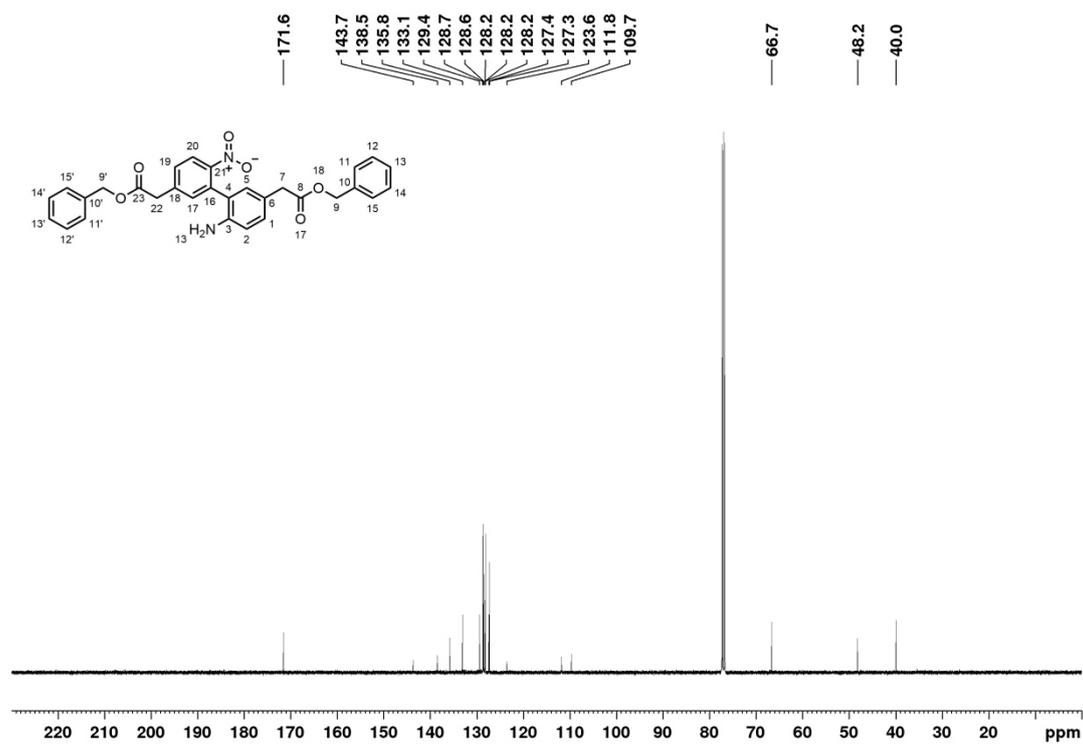
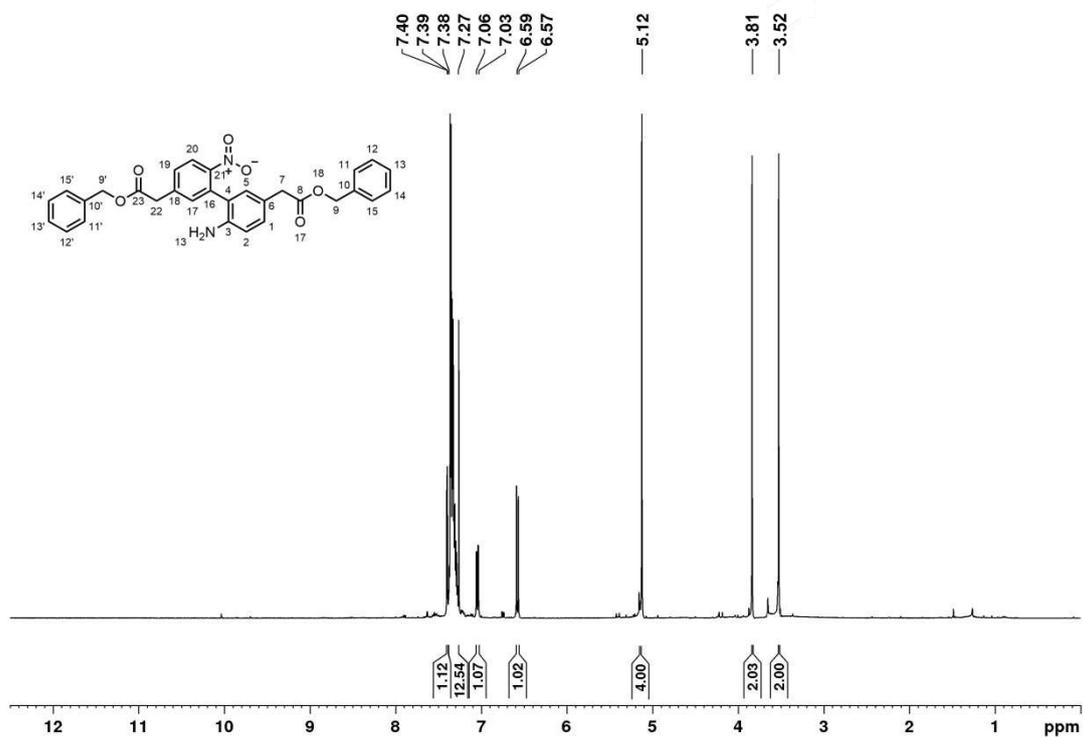
## Dibenzyl-2,2'-(6,6'-dinitro-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (38)



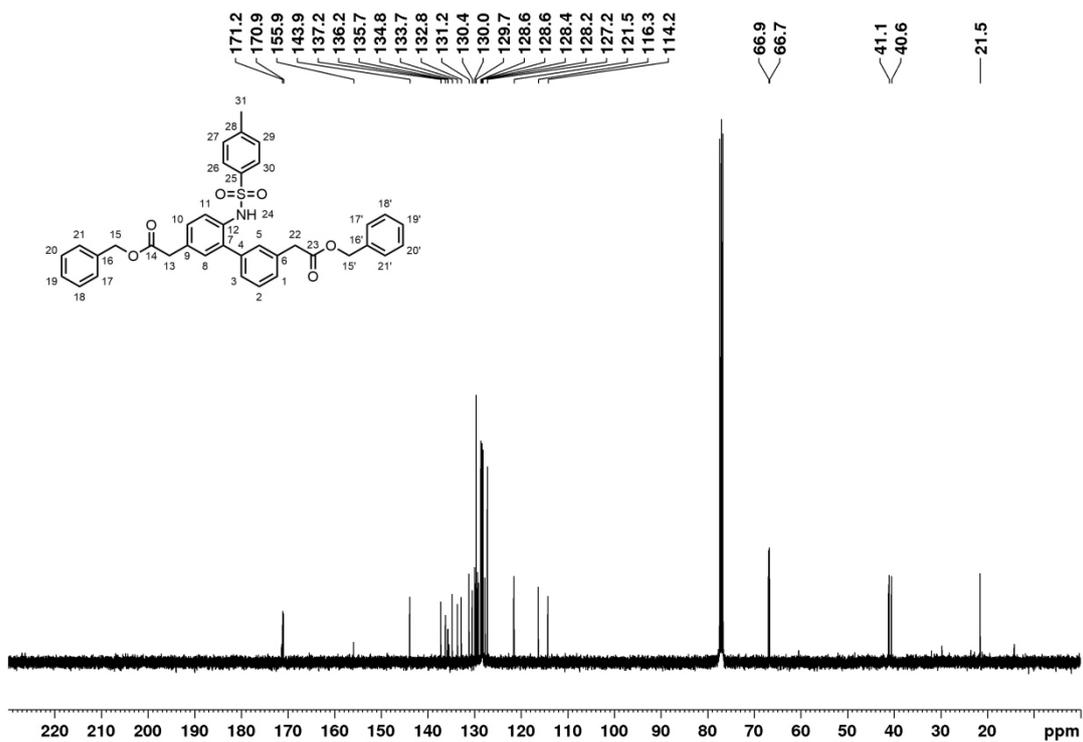
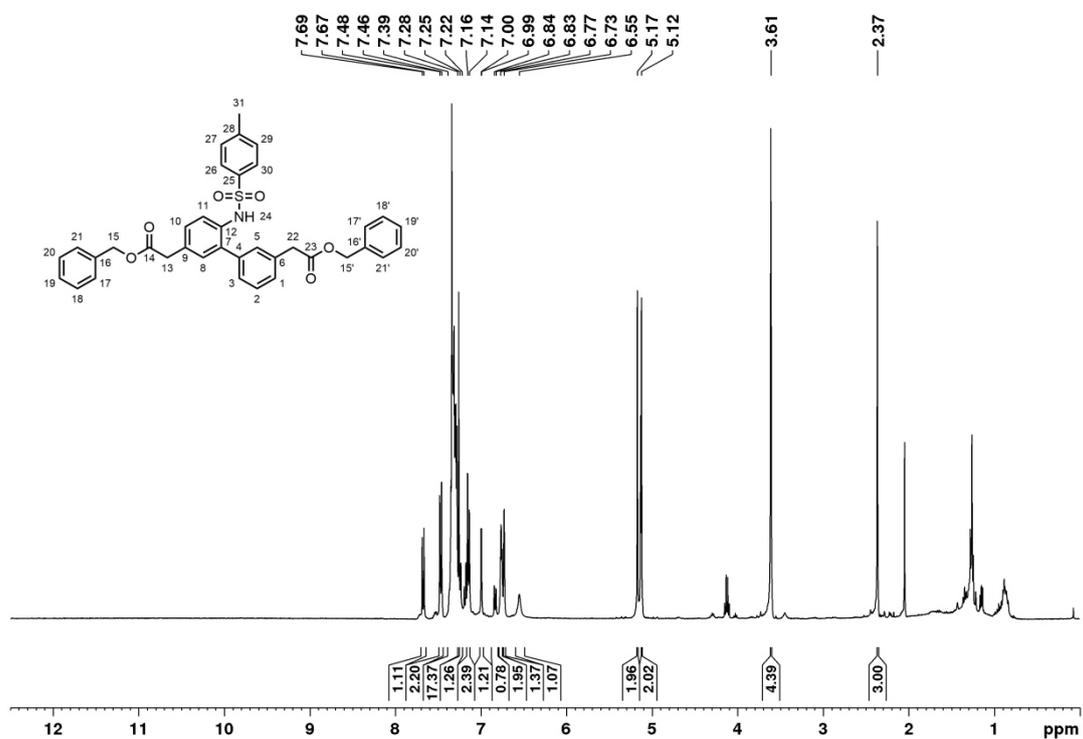
## Dibenzyl-2,2'-(6-hydroxy-6'-nitro-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (36)



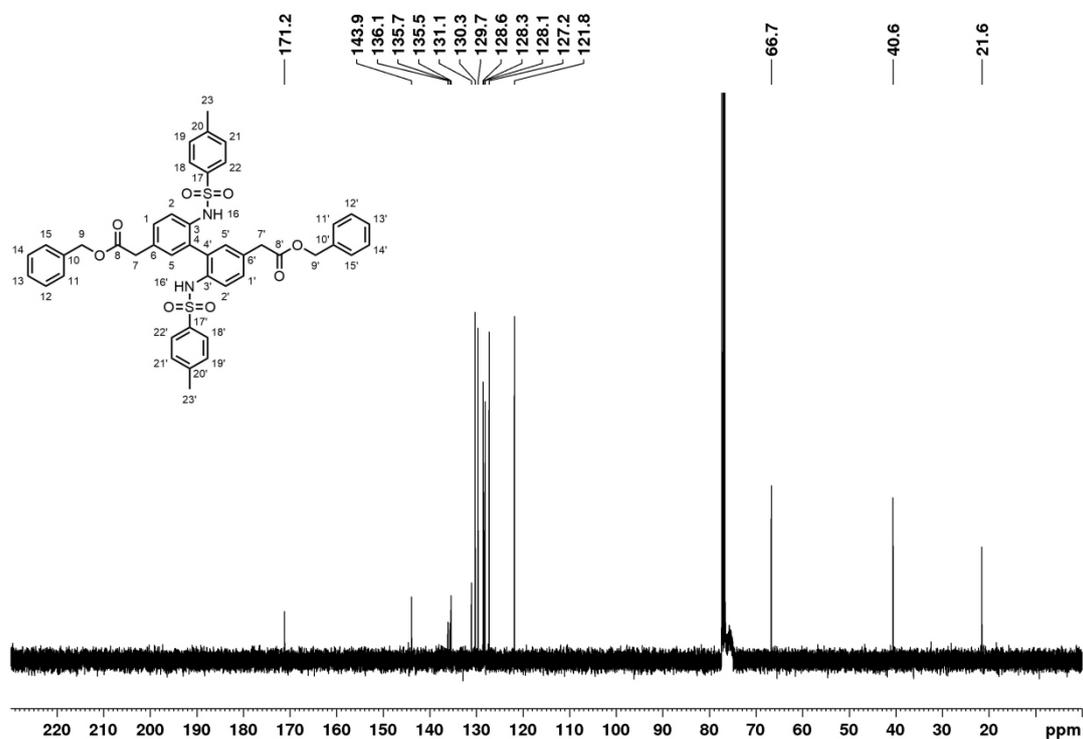
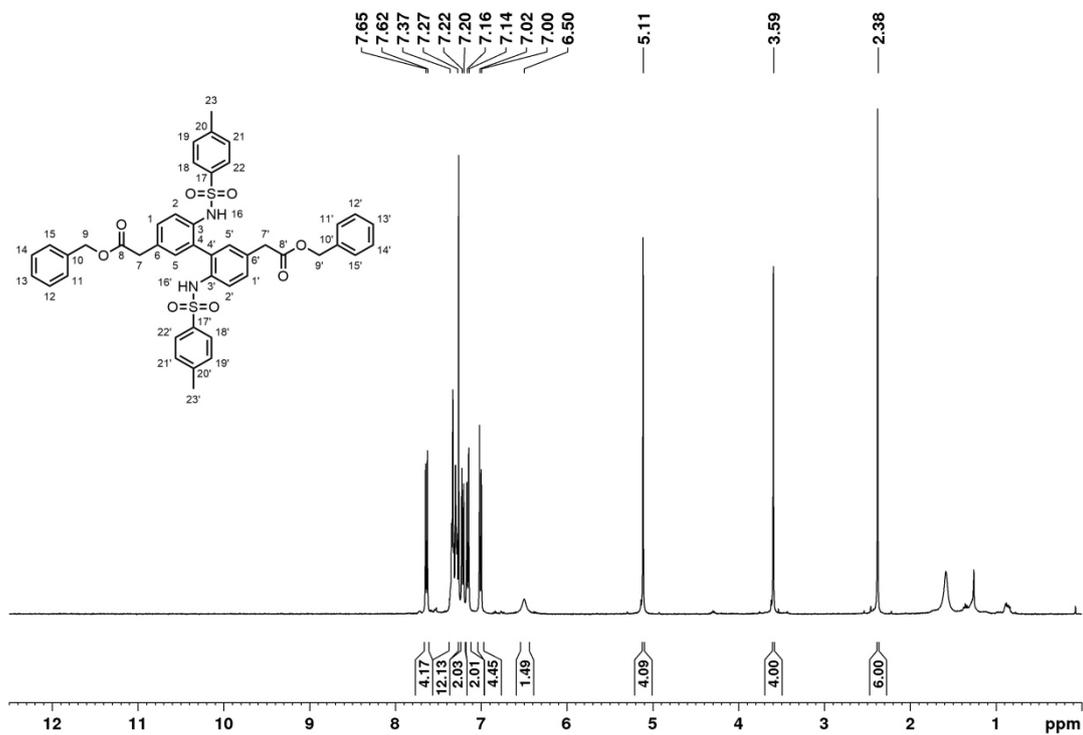
## Dibenzyl-2,2'-(6-amino-6'-nitro-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (35)



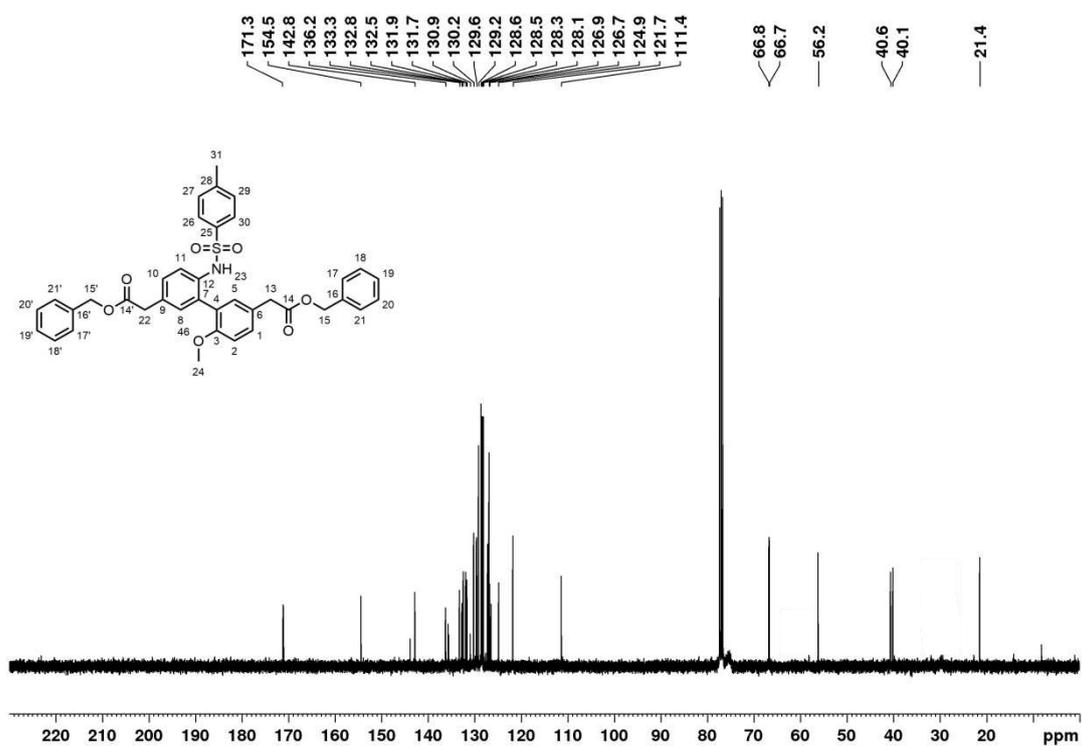
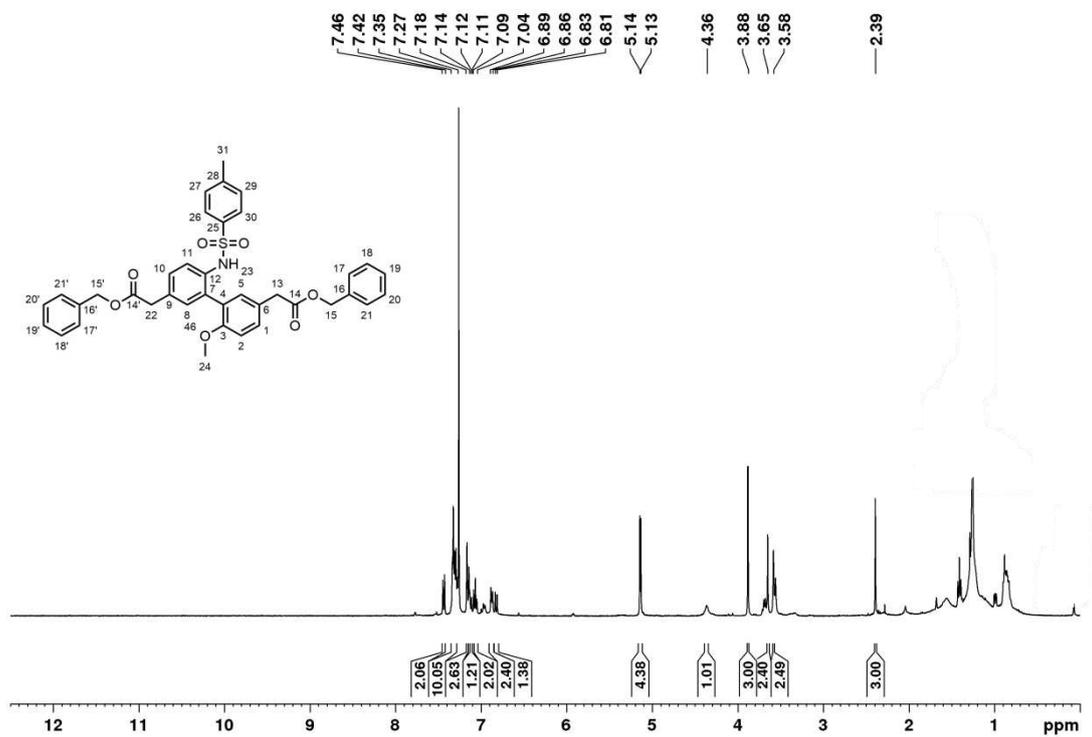
## Dibenzyl-2,2'-(6-((4-methylphenyl)sulfonamido)-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (45)



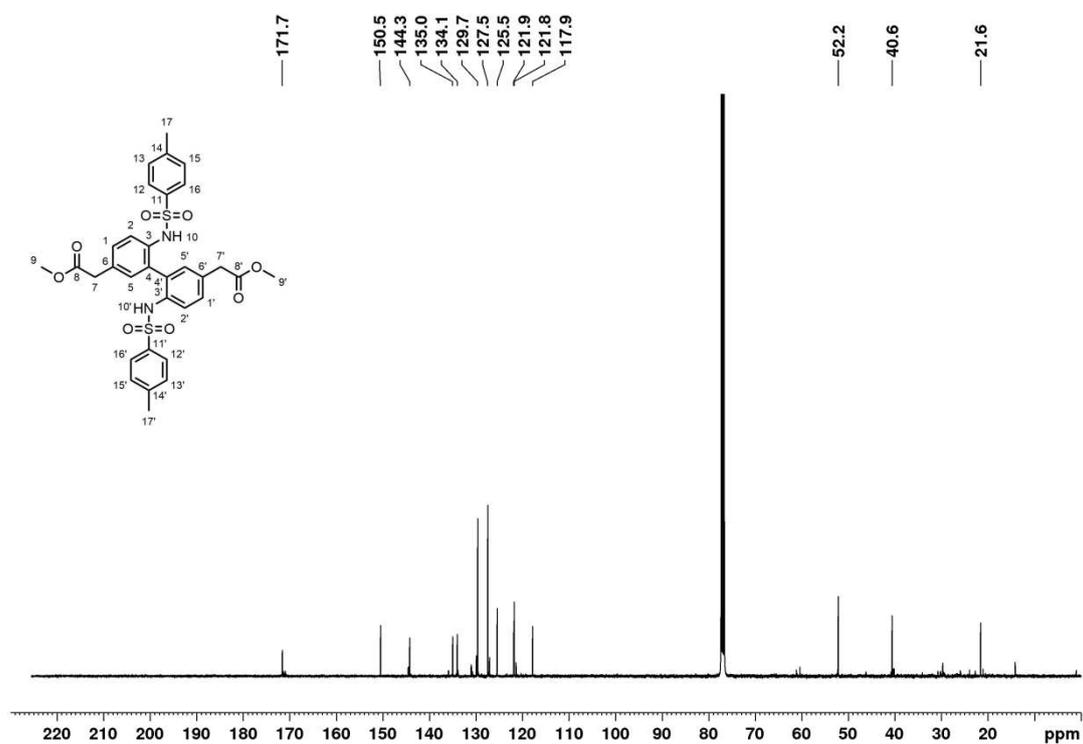
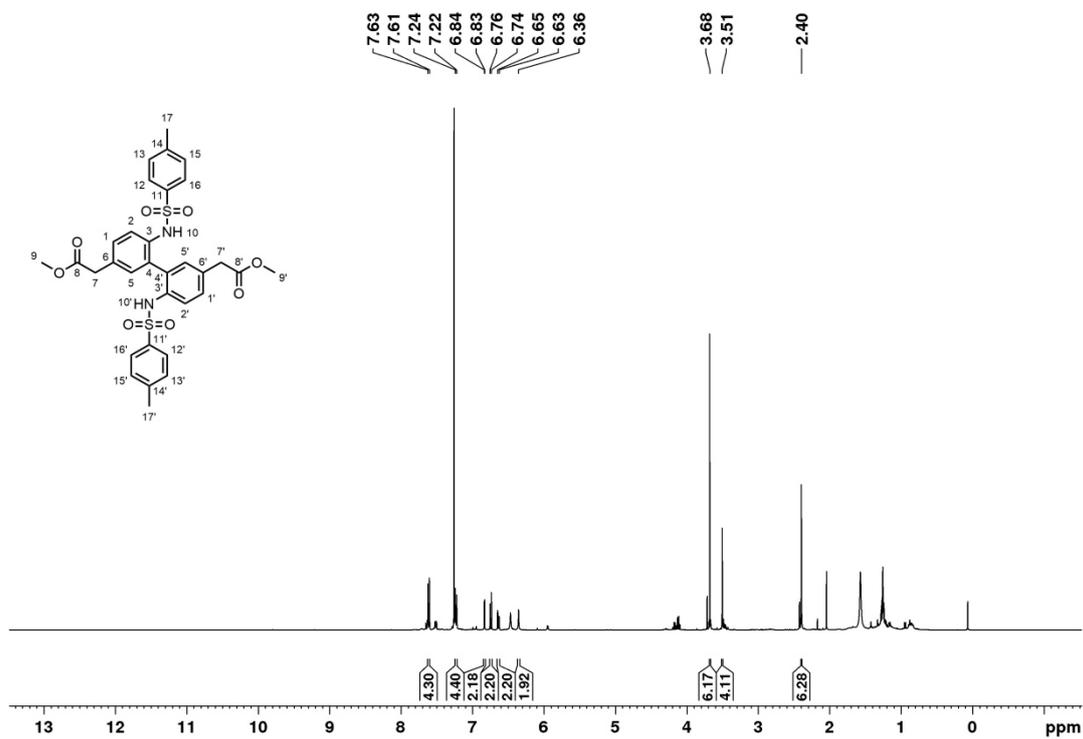
## Dibenzyl-2,2'-(6,6'-bis((4-methylphenyl)sulfonamido)-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (48)

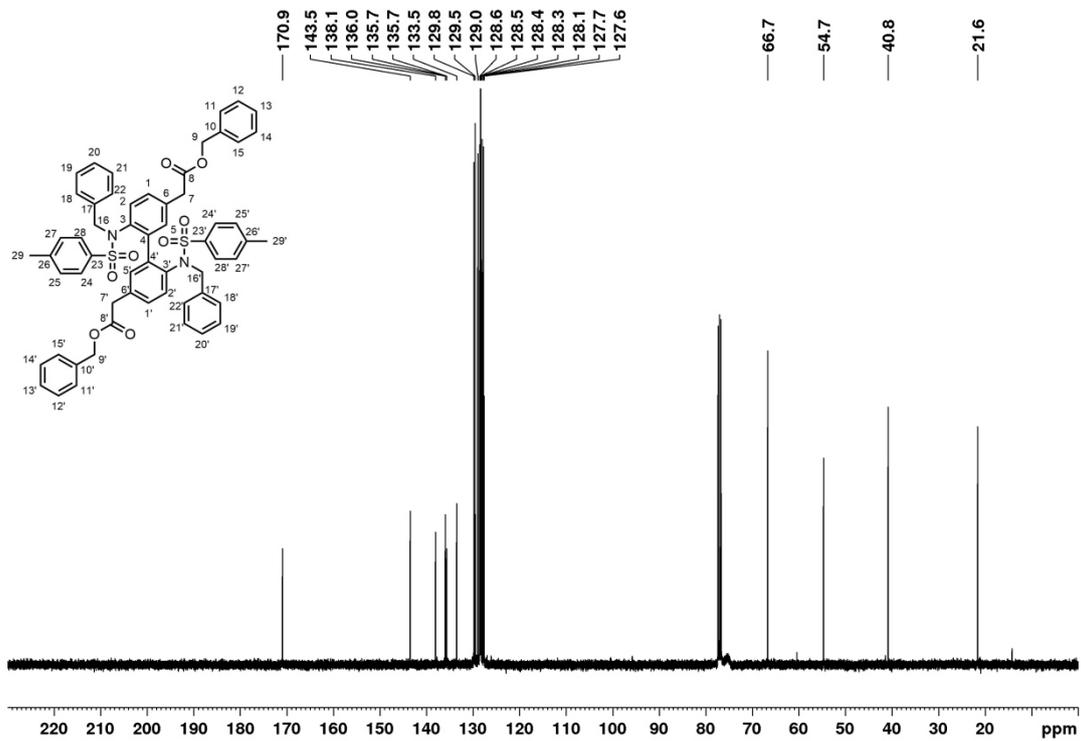
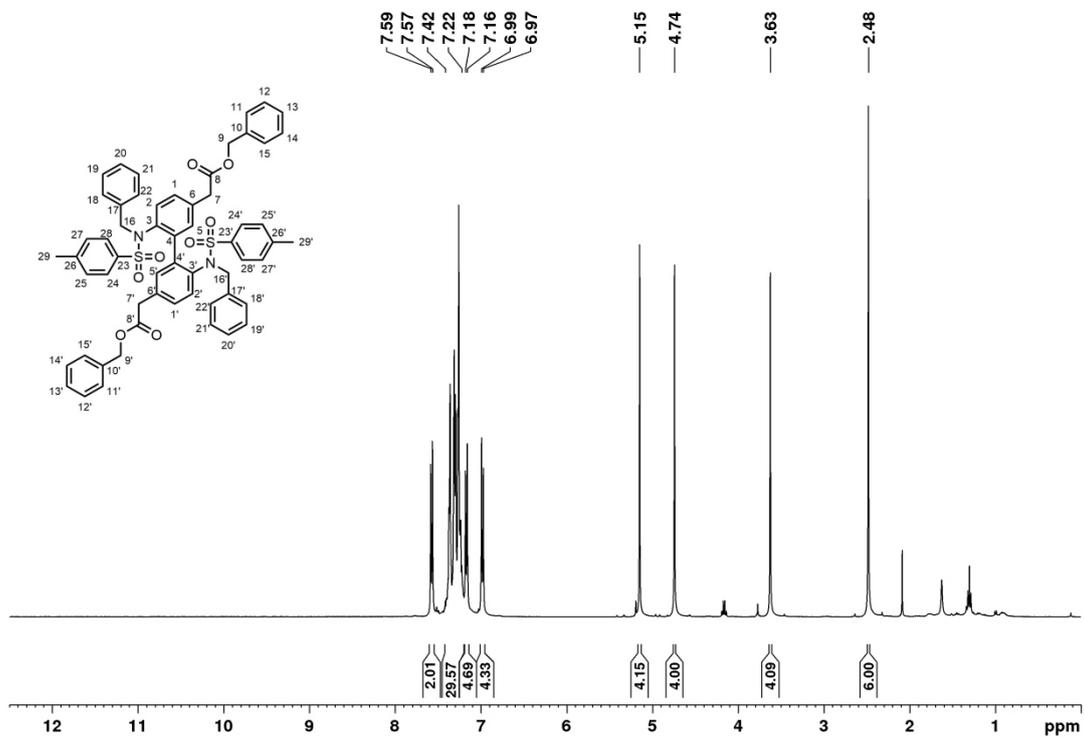


## Dibenzyl-2,2'-(6-methoxy-6'-((4-methylphenyl)sulfonamido)-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (49)

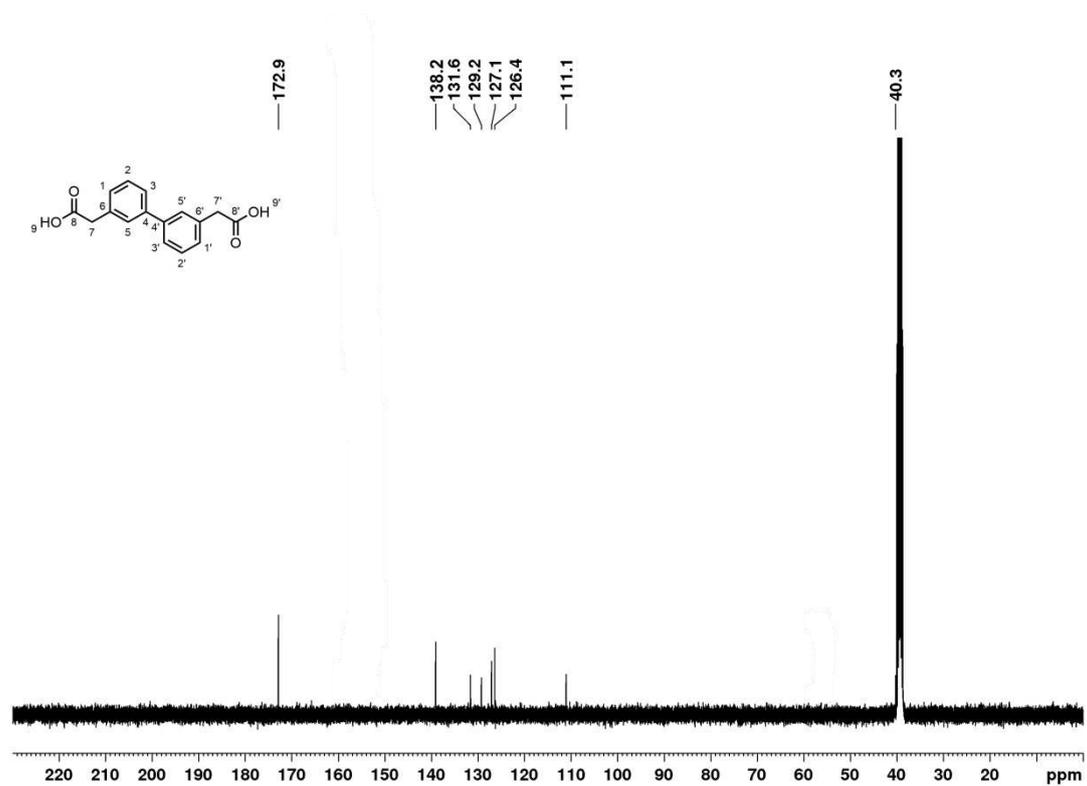
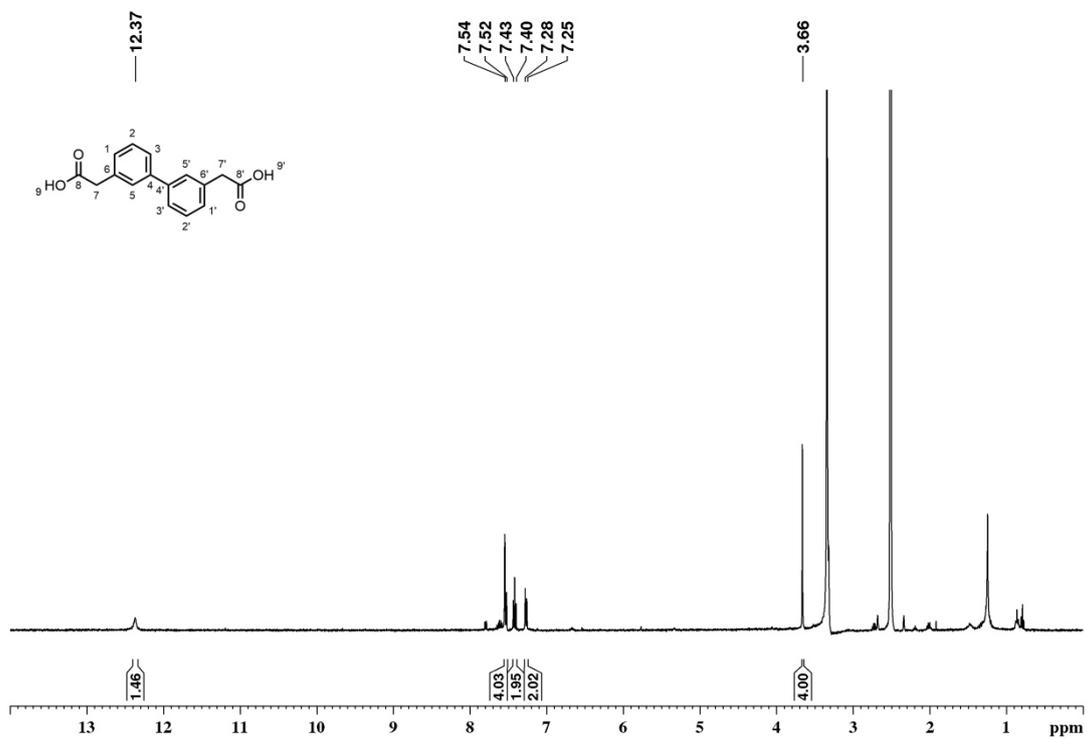


## Dimethyl-2,2'-(6,6'-bis((4-methylphenyl)sulfonamido)-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (47)

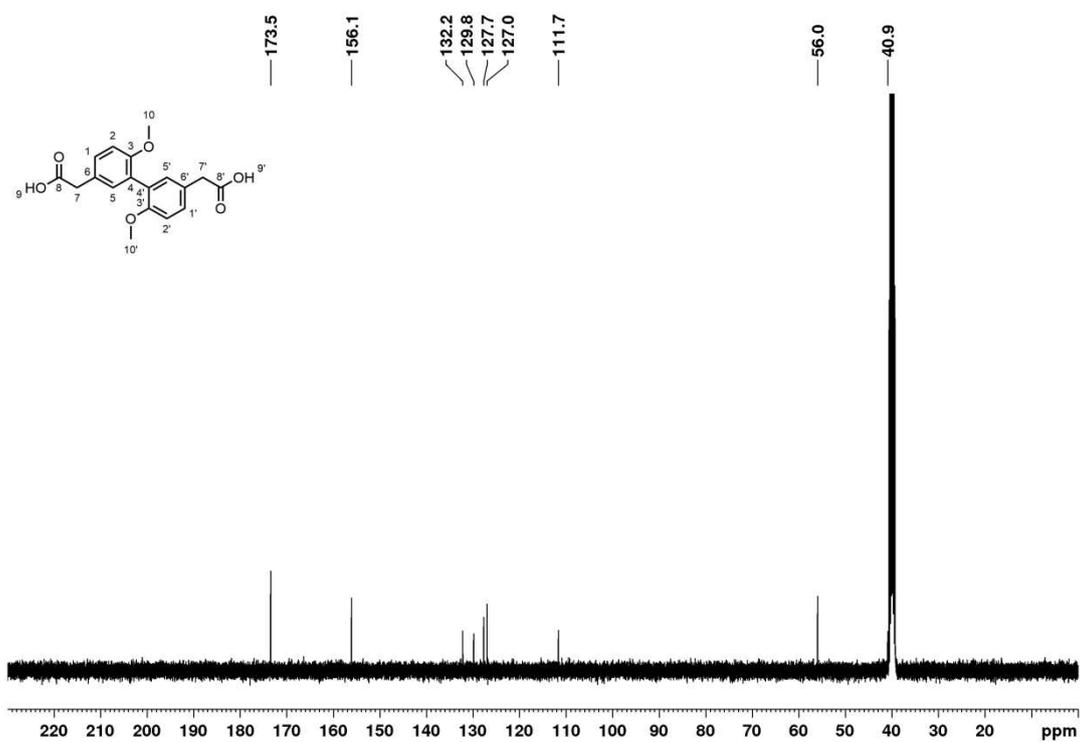
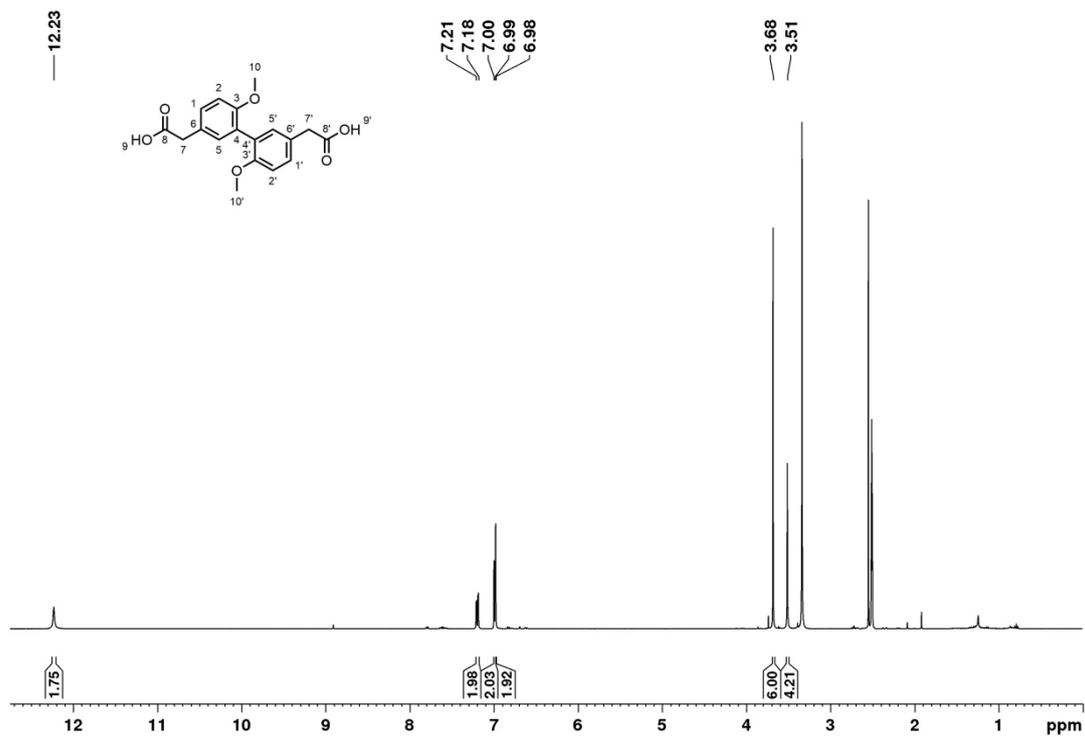


**Dibenzyl-2,2'-(6-((N-benzyl-4-methylphenyl)sulfonamido)-6'-(N-benzylphenyl)sulfonamido)-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (50)**

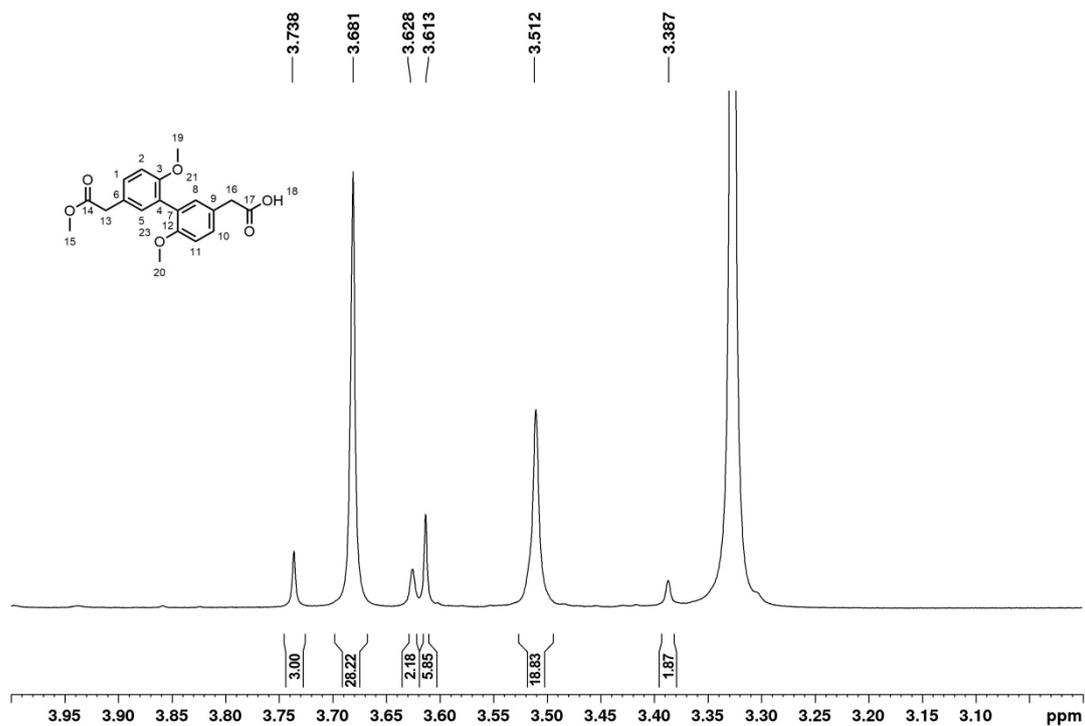
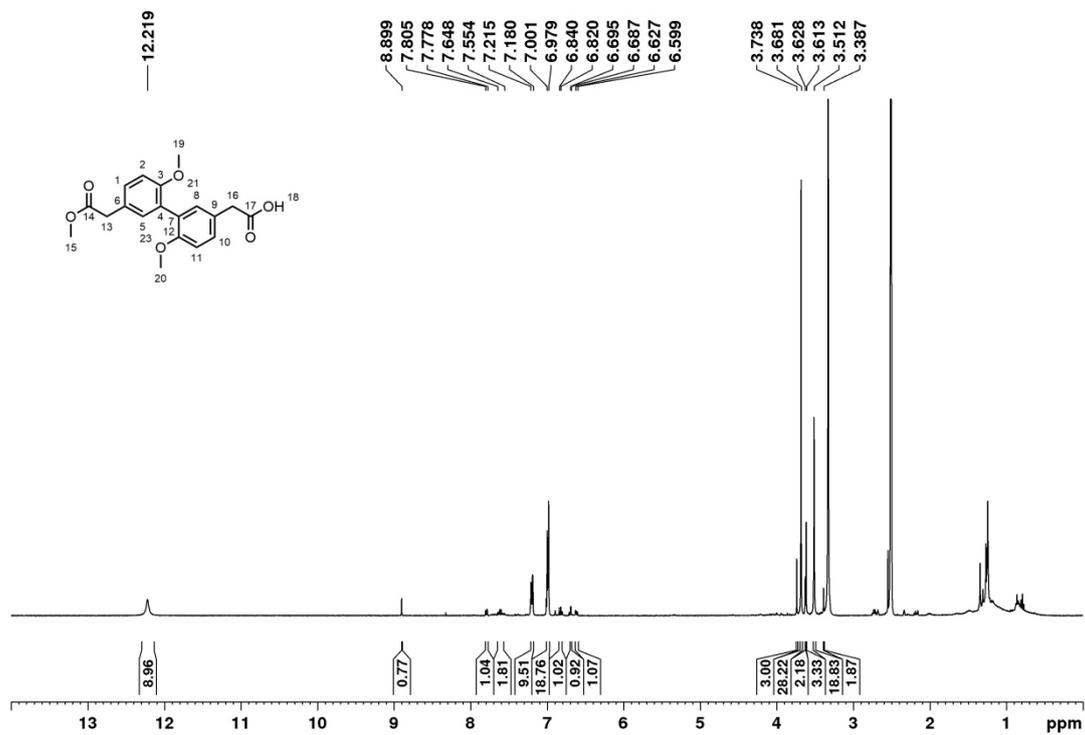
## 2,2'-([1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diessigsäure (51)



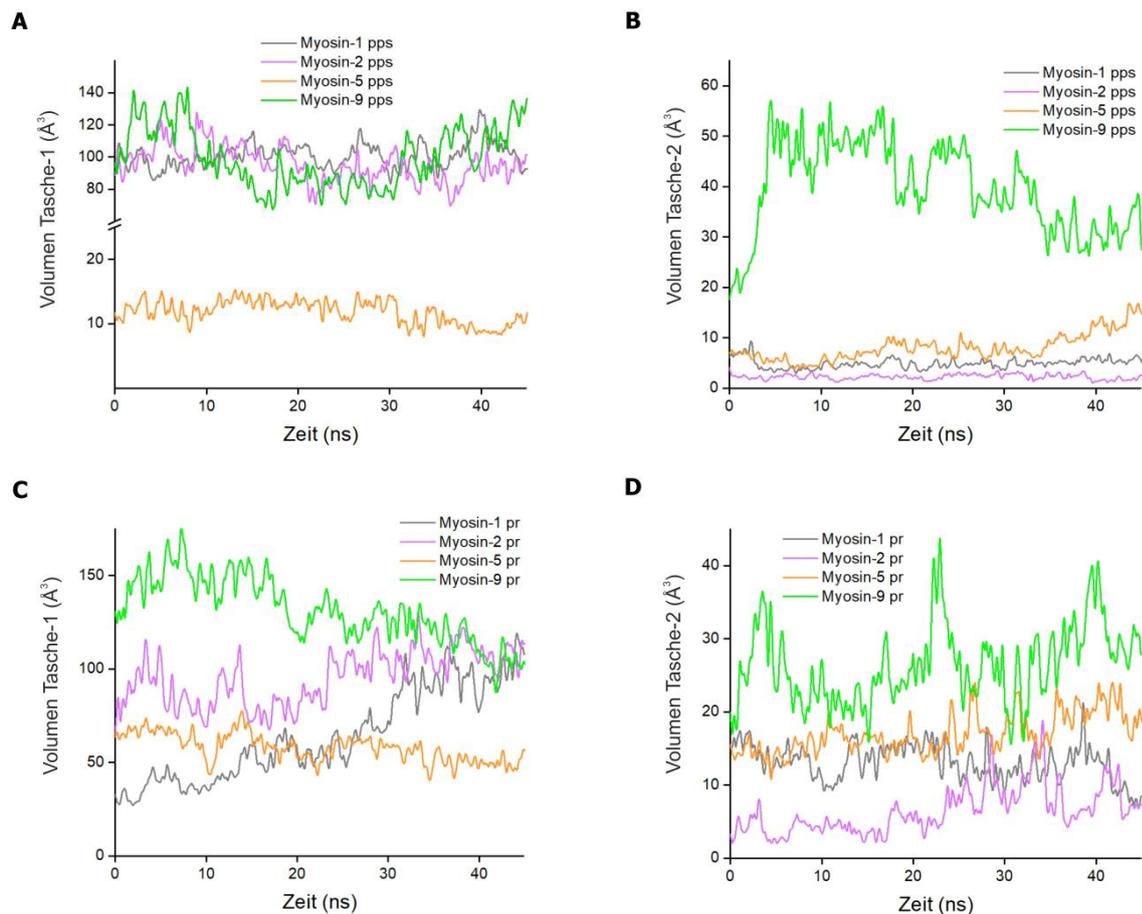
## 2,2'-(6,6'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diessigsäure (52)



## 2-(2',6-dimethoxy-5'-(2-methoxy-2-oxoethyl)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)essigsäure (53)



## 7.2 Bestimmung der Taschenvolumina



### 7.2.1 Vergleich der Zusammensetzung der allosterischen Taschen 1 und 2

Myosin-1 gegen Myosin-9:

- Tasche-1

Aminosäuresequenz (Myosin-1): 143 (L), 146 (F), 160-163 (FGKY), 180-186 (TNYLLEK), 354 (K), 357-362 (YERLFN), 365 (V), 387-388 (IY), 398 (F), 402 (N), 523 (N), 525 (D), 561-570 (TAGSQFRNAM), 572-573 (AL)

Aminosäuresequenz (Myosin-9): 140 (L), 143 (F), 157-160 (FGKF), 177-183 (EKYLLEK), 344 (K), 347-352 (YSALFD), 355 (V), 382-383 (IF), 393 (F), 397 (C), 512 (N), 514 (D), 576-575 (GVSSPVTRSH), 588-589 (EL)

➔ Sequenzielle Ähnlichkeit: 69%

- Tasche-2

Aminosäuresequenz (Myosin-1): 99-105 (ISGESGA), 107-108 (KT), 111 (S), 157-162 (SSRFGK), 182-187 (YLLEKSR), 198(F), 385-391 (LDIYGFE), 393 (F), 399-400 (EQ), 402 – 403 (NI)

Aminosäuresequenz (Myosin-9): 98-104 (ISGESGS), 106-107 (KT), 110 (T), 154-159 (SSRFGK), 179-185 (YLLEKSR), 196(Y), 380-386 (LDIFGF), 388 (F), 394-395 (EQ), 397 – 398 (CI)

➔ Sequenzielle Ähnlichkeit: 86%

Myosin-2 gegen Myosin-9:

- Tasche-1

Aminosäuresequenz (Myosin-2): 222 (L), 225 (F), 238-242 (FGKF), 259-265 (QSYLLEK), 423 (K), 426-431 (YGRLFL), 434 (V), 455-456 (IS), 466 (F), 470 (C), 588 (N), 590 (D), 629-638 (TVAAQYKEQL), 640-641 (SL)

Aminosäuresequenz (Myosin-9): 140 (L), 143 (F), 157-160 (FGKF), 177-183 (EKYLLEK), 344 (K), 347-352 (YSALFD), 355 (V), 382-383 (IF), 393 (F), 397 (C), 512 (N), 514 (D), 576-575 (GVSSPVTRSH), 588-589 (EL)

➔ Sequenzielle Ähnlichkeit: 59%

- Tasche-2

Aminosäuresequenz (Myosin-2): 177-183 (ITGESGA), 185-186 (KT), 189 (T), 236-241 (SSRFGK), 261-267 (YLLEKSR), 278(Y), 453-459 (LDISGF), 461 (F), 467-468 (EQ), 470 – 471 (CI)

Aminosäuresequenz (Myosin-9): 98-104 (ISGESGS), 106-107 (KT), 110 (T), 154-159 (SSRFGK), 179-185 (YLLEKSR), 196(Y), 380-386 (LDIFGF), 388 (F), 394-395 (EQ), 397 – 398 (CI)

➔ Sequenzielle Ähnlichkeit: 92%

Myosin-5 gegen Myosin-9:

- Tasche-1

Aminosäuresequenz (Myosin-5): 201 (T), 204 (V), 218-221 (FGKY), 238-244 (STYLLEK), 403 (K), 406-411 (YAHLLFD), 414 (V), 437-439 (IY), 447 (F), 451 (C), 566 (N), 568 (D), 623-632 (TVGSKFRSSL), 634-635 (LL)

Aminosäuresequenz (Myosin-9): 140 (L), 143 (F), 157-160 (FGKF), 177-183 (EKYLLEK), 344 (K), 347-352 (YSALFD), 355 (V), 382-383 (IF), 393 (F), 397 (C), 512 (N), 514 (D), 576-575 (GVSSPVTRSH), 588-589 (EL)

➔ Sequenzielle Ähnlichkeit: 56%

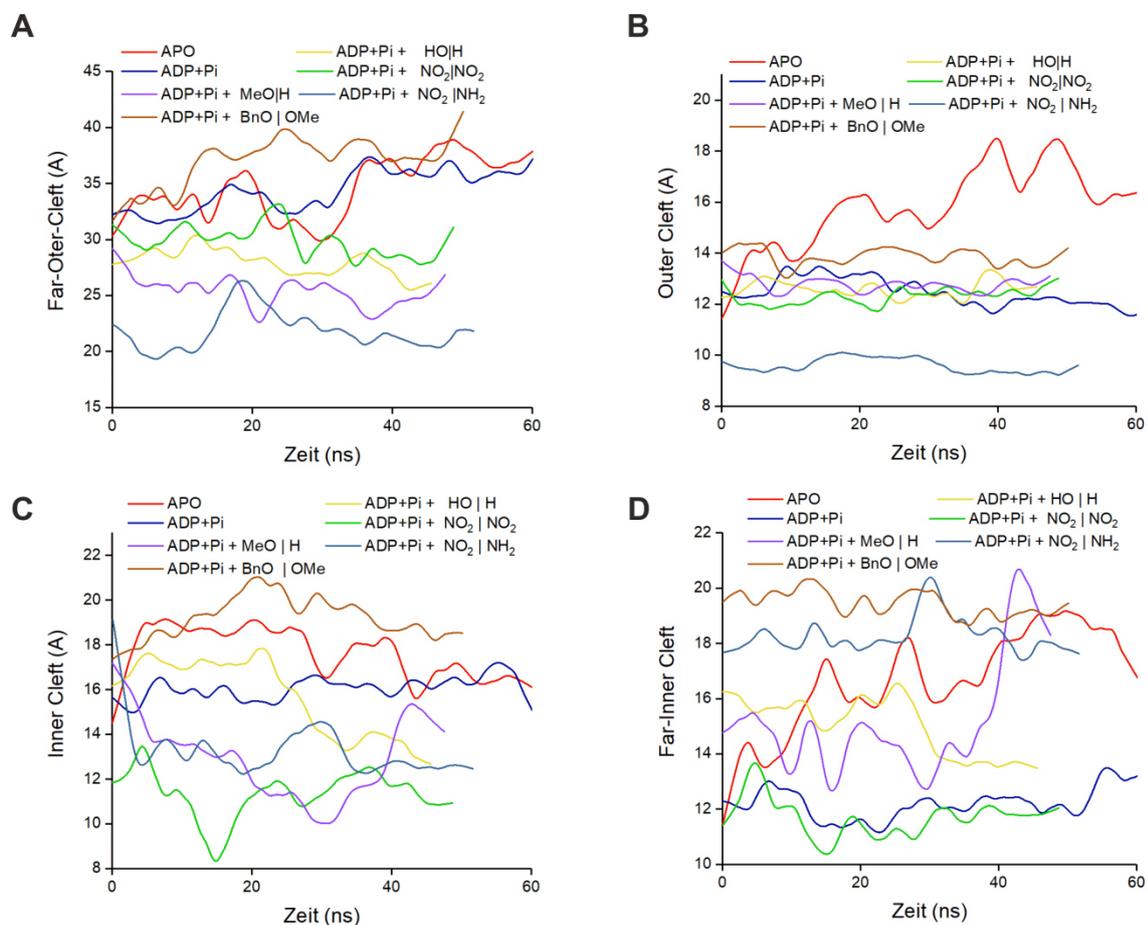
- Tasche-2:

Aminosäuresequenz (Myosin-5): 159-165 (VSGESGA), 167-168(KT), 171(A), 215-220 (SSRFGK), 240-246 (YLLEKSR), 257(Y), 434-440 (LDIYGFE), 442 (F), 448-449 (EQ), 451-452(CI)

Aminosäuresequenz (Myosin-9): 98-104 (ISGESGS), 106-107 (KT), 110 (T), 154-159 (SSRFGK), 179-185 (YLLEKSR), 196(Y), 380-386 (LDIFGFE), 388 (F), 394-395 (EQ), 397 – 398 (CI)

→ Sequenzielle Ähnlichkeit: 89%

### 7.3 Messungen der Cleftbereiche



## 8 Lebenslauf

### Dmitrij Malcev

Adresse: An der Johanniskirche 2, 30629 Hannover  
Geburtsdatum: 28.03.1989 Nasywajewsk (Russland)  
Tel.: 01743916085  
Email: dmitrij.malcev@hotmail.de



#### Berufserfahrung

Seit 10/2015

**Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Leibniz Universität Hannover/Medizinische Hochschule Hannover (Note 1.0),** Hannover, Deutschland

- Aufstellung und Durchführung synthetischer Prozesse. Reaktionsmonitoring und Auswertung, Analyse und Charakterisierung organischer Verbindungen. *In-vitro* Aktivitäts- und Affinitätsbestimmung in Rahmen des QSAR.
- Eigenständige Entwicklung von zielgerichteten Wirkstoffen anhand von *in-silico* molekulardynamischen Simulationen und Dockingexperimenten, sowie QSAR-Studien. Optimierung von Simulationsansätzen und Voraussagemethoden. Ermittlung von Struktur-Aktivitätshintergründen der Protein-Ligand-Interaktionen.
- Führen und Anleiten von Praktikanten, sowie Betreuung von Abschlussarbeiten.
- Doktorarbeit: "Design und Synthese allosterischer Inhibitoren für *Apicomplexa* Bewegungsmaschinerie" Betreuer: Prof. Dr. Matthias Preller.

09/2014 – 12/2014

**Produktion, Praktikant, Honeywell Specialty Chemicals GmbH, Seelze, Deutschland**

- Optimierung des Reaktionssystems basierend auf der statistischen Softwareauswertung von Repräsentativexperimenten.
- Etablierung von Ersatzsynthese für einen risikobehafteten Produktionsansatz; Optimierung des Scale-Up-Prozess.
- Anleitung des technischen Laborpersonals bei der Auswertung und Durchführung von industriellen Produktionsprozessen im Labormaßstab unter anaeroben Bedingungen. Risikoeinschätzung und Aufstellung von Präventivmaßnahmen.

#### Akademischer Werdegang

10/2013 – 09/2015

**Leibniz Universität Hannover, M.Sc. Wirk- und Naturstoffchemie (Note:1.8),** Hannover, Deutschland

- Organische Synthese, analytische Methoden der Reaktionsführung und Produktcharakterisierung, Grundlagen der Fermentation, Eigenschaften und Spezifitäten von Natur- und Wirkstoffprodukten.
- Masterarbeit: „Untersuchungen von DIELS-ALDER-Cycloadditionen und FRIEDEL-CRAFTS-Reaktionen in Durchfluss-Systemen unter Hochdruck-Hochtemperaturbedingungen in Gegenwart von Wasser“  
Betreuer: Prof. Dr. Andreas Kirschning.

10/2010 - 02/2014

**Leibniz Universität Hannover, B. Sc. Chemie (Note: 1.9),** Hannover, Deutschland

- Bachelorarbeit: „Studien zur Optimierung von DIELS-ALDER-Reaktionen für chemo-/hyperthermische Krebstherapie“  
Betreuer: Prof. Dr. Andreas Kirschning

#### Fähigkeiten

**Sprachen:** Deutsch (MS), Russisch (Muttersprache), Englisch (verhandlungssicher), Spanisch (Grundkenntnisse)

**IT:** MS Office, ChemDraw, TopSpin, Pymol, VMD, Schroedinger Tools, MestreNova, MGL-Tools, Origin